



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA ADHERENCIA DE OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA  
A *Escherichia coli***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**BRENDA PONCE MARTÍNEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor: HERMILO LEAL LARA**

**VOCAL:**              **Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN**

**SECRETARIO:**      **Profesor: ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO**

**1er. SUPLENTE:**    **Profesor: ILIANA ELVIRA GONZALEZ**

**2° SUPLENTE:**      **Profesor: HIRAM FERNANDO RAMIREZ CAHERO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA  
PLANTA PILOTO 2 DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

Brenda Ponce Martínez \_\_\_\_\_

## INDICE

RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
MARCO TEÓRICO .....	8
Leche humana.....	8
Composición de la leche humana .....	10
Oligosacáridos.....	11
Estructura de los oligosacáridos de leche humana.....	15
Oligosacáridos fucosilados.....	17
Efecto directo e indirecto de los oligosacáridos de leche humana .....	18
Estudios relacionados .....	22
Colonización del intestino del recién nacido.....	23
Familia Enterobacteriaceae.....	24
Mecanismos de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> .....	26
OBJETIVOS.....	27
Objetivo general .....	27
Objetivos particulares.....	27
Establecer teóricamente el tipo de OLH que se encuentran en las muestras de leche estudiadas y a cuáles de ellos se adhiere <i>Escherichia coli</i> . .....	27
Hipótesis de trabajo.....	27
METODOLOGÍA .....	28
Pruebas con carbohidratos.....	29
<i>Activación y acondicionamiento de Escherichia coli</i> . .....	29
<i>Preparación de los carbohidratos de estudio</i> . .....	29
<i>Pruebas de adherencia</i> . .....	29
<i>Cuantificación de carbohidratos mediante HPLC</i> .....	30
Pruebas con oligosacáridos de leche humana.....	32
<i>Liberación de fucosa de oligosacáridos de leche humana empleando fucosidasa</i> . .	33
<i>Fucosidasa de Xanthomonas manihotis</i> .....	33
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
<i>Pruebas de adherencia de Escherichia coli con los carbohidratos</i> .....	35

<i>Cuantificación de OLH</i> .....	40
Pruebas de adherencia con OLH.....	43
Cuantificación de oligosacáridos defucosilados.....	45
Pruebas de adherencia con OLH defucosilados.....	46
CONCLUSIONES .....	49
BIBLIOGRAFÍA .....	50
ANEXOS.....	55

## RESUMEN

Se ha demostrado que los oligosacáridos de leche humana confieren muchos beneficios al infante, ya que contribuyen a un buen desarrollo del sistema inmunológico y ayudan a proteger el tracto gastrointestinal que a partir del nacimiento empieza a ser habitado por microbiota que la madre le trasfiere al bebé.

En el proceso de colonización participan diversas bacterias que provienen de la materia fecal y vaginal de la madre sin embargo, también interviene el medio ambiente que rodea al infante. Adicionalmente, la leche humana juega un papel importante para el desarrollo del lactante, pues proporciona a éste diversos nutrientes, algunos de ellos con propiedades prebióticas y antimicrobianas, además de microorganismos probióticos.

Uno de los microorganismos que empieza a colonizar el intestino del neonato es *Escherichia coli*, un bacilo Gram negativo que causa comúnmente enfermedades en el tracto intestinal de los recién nacidos.

El presente estudio tiene como principal objetivo comprobar la importancia de la fucosa en los oligosacáridos de leche humana y su efecto anti infeccioso por exposición a células de *Escherichia coli* mediante pruebas de adherencia y la posterior cuantificación de los oligosacáridos antes y después de la prueba, haciendo uso de la técnica analítica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Al comparar el perfil obtenido de los oligosacáridos de leche humana luego de la prueba de adherencia con el perfil obtenido de los oligosacáridos  $\alpha$ 1-2 defucosilados, las células de *Escherichia coli* presentaron menor adherencia en los oligosacáridos  $\alpha$ 1-2 defucosilados que en los oligosacáridos que estaban estructuralmente completos.

Con estos resultados se comprueba que la fucosa presenta un papel importante en los oligosacáridos ya que se sabe que es un sitio de reconocimiento para las células de *Escherichia coli*, lo que contribuye a la adherencia en el intestino reduciendo la incidencia de infección por este patógeno.

## INTRODUCCIÓN

La leche humana es el alimento ideal para el lactante, pues ésta, posee diversos macronutrientes, micronutrientes y compuestos bioactivos. La leche humana posee más de 130 oligosacáridos distintos, estos conforman el tercer componente más importante después de la lactosa y los lípidos y están presentes en mayor cantidad que las proteínas; están formados por una combinación variable de D-glucosa, D-galactosa, ácido siálico, L-fucosa, y N-acetilglucosamina (*Kunz, 1993*).

La concentración de oligosacáridos varía generalmente de acuerdo al periodo de lactancia, momento del día y herencia genética. Los oligosacáridos más abundantes en la leche humana son los oligosacáridos libres (no conjugados) y neutros; estos últimos contienen fucosa en el extremo terminal ya sea unida por enlaces  $\alpha[1-2]$ ,  $\alpha[1-3]$  o  $\alpha[1-4]$ .

Se sabe que los oligosacáridos de leche humana tienen un efecto anti-infeccioso que protege a los infantes al prevenir que los patógenos se adhieran a las células del tejido epitelial, ya que estos oligosacáridos son receptores solubles análogos de los carbohidratos de la superficie celular y compiten con los ligandos epiteliales por las bacterias patógenas y los virus (*Newburg, 2000*), es por ello, que tienen un rol muy importante en la prevención de infecciones en el lactante.

A pesar de que actualmente se reconoce la importancia biológica de los oligosacáridos presentes en la leche humana para la salud del lactante, se desconocen muchos aspectos estructurales y comportamiento metabólico de estos compuestos.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que algunas bacterias patógenas, se unen a oligosacáridos de leche humana, lo que les confiere capacidad de inhibir la adhesión celular y a prevenir el desarrollo de enfermedades (*Brand et al., 1995*).

Los oligosacáridos de leche humana al tener similitud estructural con los receptores celulares de bacterias como *Escherichia coli* pueden impedir la colonización del intestino evitando el proceso infeccioso, de manera que en el presente trabajo se probó poner en contacto células de *Escherichia coli* con los oligosacáridos de leche humana con el fin establecer una técnica relativamente sencilla que nos pudiera servir para saber si dicha bacteria se adhiere a los oligosacáridos, y con ello obtener una aproximación sobre qué tipo de oligosacáridos ejercen mayor efecto protector en el infante, impidiendo infecciones gastrointestinales causadas por este patógeno.

Los oligosacáridos fucosilados son capaces de impedir la unión de las enterotoxinas de *Escherichia coli* a las células epiteliales del intestino, es por ello que la fucosa es importante para que se lleve a cabo la adherencia. En este trabajo se realizó una reacción de hidrólisis de fucosa en los oligosacáridos de leche humana con el objetivo de observar el efecto protector de estos oligosacáridos sin fucosa unido por el enlace  $\alpha[1-2]$ .



## MARCO TEÓRICO

### Leche humana

Es un complejo fluido biológico que se adapta a los requerimientos nutricionales e inmunológicos del niño durante los primeros 6 meses de vida, contiene muchos componentes bioactivos, enzimas y hormonas los cuales intervienen en la protección contra la invasión de agentes patógenos (*Harris, 2006*).

La leche humana es el alimento de elección durante el periodo lácteo, ya que crea lazos afectivos entre madre e hijo, además de aportar una combinación de nutrientes y energía equilibrada para el crecimiento y desarrollo del lactante.

Los diferentes tipos de leche que se producen en la glándula mamaria son los siguientes: pre-calostro, calostro, leche de transición, y leche madura.

El pre-calostro se acumula en los alveolos durante el último trimestre de la gestación está compuesto de exudado plasmático, inmunoglobulinas, lactoferrina, seroalbúmina, cloro, sodio y lactosa (*Lawrence, 1996*).

El calostro se produce durante los 4 días posteriores al parto, es de escaso volumen y alta densidad. Contiene menos cantidades de lactosa, grasa y vitaminas hidrosolubles que la leche madura y mayor cantidad de proteínas, vitaminas liposolubles (E, A, K, D), carotenos y algunos minerales como sodio y zinc. El  $\beta$ -caroteno le confiere el color amarillento y el sodio un sabor ligeramente salado.

El escaso volumen del calostro es ideal para el recién nacido, ya que los riñones inmaduros de éste no pueden manejar grandes cantidades de líquidos, sus enzimas facilitan la digestión del bebé debido a que la lactasa y otras enzimas intestinales están inmaduras; sus inmunoglobulinas cubren el endotelio del tubo digestivo y funcionan también como un primer mecanismo de anti-adherencia de los patógenos.

La leche de transición, es la leche que se produce entre el cuarto y el décimo quinto día después del parto, a partir del sexto día del parto empieza a aumentar la producción de leche hasta alcanzar un volumen que va de los 600 a los 800 ml/día. Durante esos días los niveles de proteínas, inmunoglobulinas y vitaminas liposolubles disminuyen, y aumentan la lactosa, las grasas, las vitaminas hidrosolubles y el valor calórico total. La leche de transición va cambiando invariablemente hasta alcanzar las características de la leche madura.

Por último, la leche humana madura tiene una gran variedad de elementos, de los cuales sólo algunos son conocidos. La variación de sus componentes se observa no sólo entre mujeres, sino también en la misma madre, entre ambas mamas, entre lactadas, durante una misma mamada y en las distintas etapas de la lactancia.

El volumen promedio de leche madura producida por una mujer es de 700 a 900 ml/día durante los 6 primeros meses postparto (Lawrence, 1989) y aproximadamente 500 ml/día en el segundo semestre. El aporte promedio de este tipo de leche es de 75 Kcal/100 ml. (*Temboury, 2007*).

La lactancia humana es de los factores más importantes que afectan inmediatamente o a corto plazo al crecimiento del infante, así como a la composición y funciones corporales. Además, la alimentación en este periodo crítico de la vida va a ejercer efectos a largo plazo sobre diferentes procesos fisiológicos y metabólicos. De esta manera la leche humana juega un papel clave en la disminución de la incidencia de enfermedades, debido a la importancia nutrimental y los efectos benéficos que presenta (*Gomez et al., 2009*).

## **Composición de la leche humana**

Los principales componentes de la leche son: agua, proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas, también contiene, hormonas y enzimas.

### ***Agua***

La leche humana contiene un 88% de agua y su osmolaridad es semejante al plasma, lo que permite al niño mantener un perfecto equilibrio electrolítico (*Räihä, 1985*).

### ***Proteínas***

Las proteínas de la leche humana están compuestas de 30% de caseína y 70% de proteínas del suero. La caseína está formada por micelas complejas de caseinato y fosfato de calcio. Las proteínas del suero son entre otras: alfa-lactoalbúmina (de alto valor biológico para el niño), seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina, lisozima, enzimas, moduladores del crecimiento, hormonas y prostaglandinas. Las inmunoglobulinas de la leche humana son diferentes a las del plasma, tanto en calidad como en concentración. La lactoferrina además de su acción bacteriostática sobre ciertos gérmenes ferodependientes (*E. coli*), contribuye a la absorción del hierro en el intestino del niño. (*Räihä, 1985*). Ocho de los veinte aminoácidos presentes en la leche son esenciales y provienen del plasma de la madre. El epitelio alveolar de la glándula mamaria sintetiza algunos aminoácidos no esenciales como la taurina que es un importante aminoácido libre de la leche humana, que el recién nacido no es capaz de sintetizar.

## **Carbohidratos.**

Los carbohidratos representan el 40-50% del contenido calórico de la leche. A pesar de ello, el interés por la composición de la leche humana y para crear fórmulas artificiales semejantes a la misma, se ha centrado en otros componentes tales como proteínas o grasas, quedando relegados los carbohidratos a un nivel secundario. Sin embargo, hoy en día se considera que algunos componentes de esta fracción son agentes saludables para el bienestar del bebé.

El carbohidrato predominante en la leche es la lactosa cuya concentración es de 6-7 g/100 ml (*Coppa et al., 1993*). La concentración de lactosa aumenta significativamente entre el segundo y tercer mes, mientras que el contenido de los otros carbohidratos (mono, di y oligosacáridos), es máximo en las primeras semanas de vida y desciende significativamente después (*Coppa et al., 1993*).

## **Oligosacáridos**

Los oligosacáridos son estructuras de más de 20 monosacáridos unidos mediante el carbono anomérico y el grupo hidroxilo de otro monosacárido, a través de un enlace glicosídico. Esta propiedad provoca gran variabilidad estructural en los oligosacáridos.

Por lo general los disacáridos naturales se pueden producir mediante los siguientes enlaces:

Enlace 1,4: El carbono anomérico se enlaza al átomo de oxígeno del carbono 4 del segundo monosacárido.

Enlace 1,6: El carbono anomérico se enlaza al átomo de oxígeno del carbono 6 del segundo monosacárido.

Las estructuras más abundantes son los disacáridos, sin embargo, estos mismos pueden irse uniendo a otro monosacárido por medio de enlaces glicosídicos para formar trisacáridos, tetrasacáridos, o en general oligosacáridos.

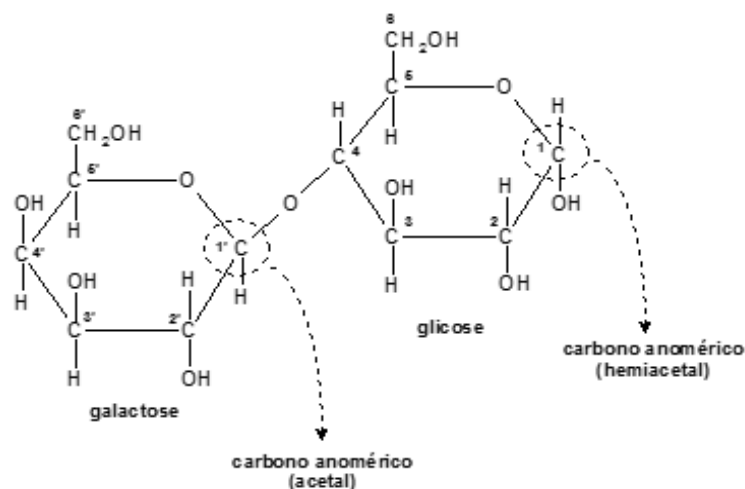


Fig 1. Representación del enlace glicosídico

Los oligosacáridos forman parte de los glicolípidos y glicoproteínas; estructuras que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática, por esta razón representan un papel importante en las funciones de reconocimiento en superficies celulares. La interacción de ciertos patógenos con células del anfitrión se da a través de glicoproteínas.

### Oligosacáridos de leche humana.

Entre los beneficios de la leche humana se encuentran componentes con capacidad funcional, es decir, que confieren un efecto prebiótico. Estos, estimulan en el colon, el desarrollo de microbiota benéfica y modulan el sistema inmunitario de manera que se ve disminuida la incidencia de procesos infecciosos gastrointestinales que comprometen la salud del infante (*Chirido et al., 2011*).

En la clasificación más sencilla, se considera que existen 3 principales categorías: oligosacáridos primarios que incluyen a los galactooligosacáridos (GOS), oligosacáridos neutros; que incluye a los oligosacáridos fucosilados y oligosacáridos ácidos, con predominio en el contenido de ácido siálico además de

los sialilfucosil-oligosacáridos, que contienen fucosa y ácido siálico. Estos oligosacáridos van cambiando de proporción en función del tiempo de lactancia. (Fig. 2) (Chirido et al.,2011).

La fucosa resulta de la reducción del carbono de un monosacárido liberando un grupo OH por lo cual es llamada desoxiazúcar. Tanto la fucosa como el ácido siálico tienen en su estructura un anillo piranósico constituido por 5 carbonos y un oxígeno formado por un hemiacetal en conformación de silla. El ácido siálico es un monosacárido derivado del ácido neuramínico.

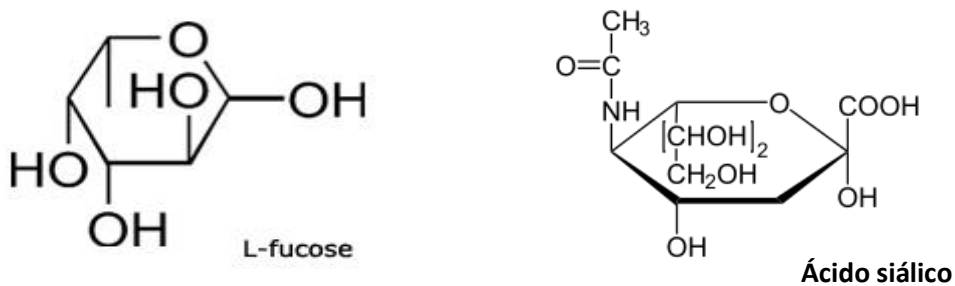


Fig. 2 Estructuras de L-fucosa y ácido siálico

Algunos de los oligosacáridos más importantes que se han encontrado son Lacto-N-tetrosa, Lacto-N-Difucohexosa o Sialil-lacto-N-tetrosa c (Tabla 1).

Tabla 1. Oligosacáridos de leche humana (Adaptado por Kunz, et al., 2000)

Oligosacáridos primarios	Fucosil-oligosacáridos	Sialil- oligosacáridos
Lacto-N-tetrosa	Lacto-N-Difucohexosa	Sialil-lacto-N-tetrosa c
Lacto-neo-tetrosa	Trifucosil-lacto-N-hexosa	6-sialil-lactosa
Lacto-N-hexosa	Difucosil-lacto-N-hexosa	Sialil-lacto-N-tetrosa a

Lacto-N-neohexosa	Difucosil-lacto-N-hexosa b	3-sialil-lactosa
	Difucosil-lacto-N-hexosa I	Sialil-lacto-N-tetrosa b
	3'-Fucosil-lactosa	Disialil-lacto-N-tetrosa
	Lacto-N-fucopentosa II	
	2'-Fucosil-lactosa	
	Lacto-N-fucopentosa I	
	Monofucosil-lacto-N-hexosa II	

Como se mencionó anteriormente, los niveles de los oligosacáridos son más elevados en el calostro que en la leche madura. Aumentan los 5 primeros días para descender a lo largo de los tres meses siguientes. También se han observado variaciones en su composición cuantitativa. Durante las primeras 13 semanas de lactancia, el ácido siálico disminuye en un 71%, la N-acetilglucosamina en un 56% y la fucosa en un 35% (figura 3). Como consecuencia de los cambios, el resto de N-acetilglucosamina pasa a ser el componente mayoritario, seguido de fucosa y ácido siálico.

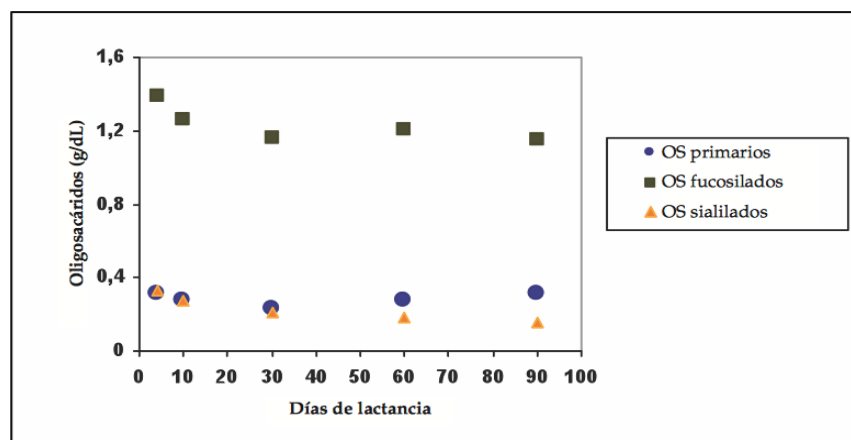


Figura 3. Gráfica de la cinética de cambio de concentración de los oligosacáridos de leche humana en función del tiempo de lactancia (Chirido et al., 2011)

La importancia biológica de esta variación en el perfil de oligosacáridos es aún desconocida, pero parece lógico pensar que los oligosacáridos formados a partir de dichos restos de monómeros serán diferentes a los del inicio de la lactancia, ya que la composición de la leche se adapta a las necesidades del niño (Miller et al., 1994).

La concentración de oligosacáridos no varía durante la toma, pero sí se observan variaciones a lo largo del día. La síntesis de oligosacáridos requiere la presencia de lactosa. Esto explica la existencia de una relación inversamente proporcional entre las concentraciones de oligosacáridos y lactosa en la leche humana (Mc Veagh et al., 1997).

### Estructura de los oligosacáridos de leche humana.

Las funciones biológicas de los oligosacáridos están íntimamente relacionadas con la conformación estructural de estos (Tabla 2). En la leche humana los oligosacáridos consisten en combinaciones de cinco diferentes monómeros: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), L-Fucosa (Fuc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico [Ácido N-acetil neurámico (NeuAc)], y su longitud varía de tres a diez residuos de monosacáridos. La lactosa se encuentra generalmente en el extremo reductor.

Tabla 2. Estructura de los oligosacáridos en la leche humana. (A. El-Hawiet et al., 2014).

Nombre	Estructura
<b>2'-fucosil lactosa</b>	$\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Glc}$
<b>3-fucosil lactosa</b>	$\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-Glc}$
<b>Difucosil lactosa</b>	$\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}[\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{3)]-}\beta\text{-D-Glc}$
<b>3'-sialil lactosa</b>	$\alpha\text{-D-Neu5Ac-(2}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glc}$
<b>6'-sialil lactosa</b>	$\alpha\text{-D-Neu5Ac-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glc}$



<b>3'-sialil-3-fucosil lactosa</b>	$\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)-[ $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)]-D-Glc
<b>Lacto-N-tetrosa</b>	$\beta$ -D-Gal-(1→3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Lacto-N-fucopentosa I</b>	$\alpha$ -L-Fuc-(1→2)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Lacto-N-fucopentosa II</b>	$\beta$ -D-Gal-(1→3)-[ $\alpha$ -L-Fuc(1→4)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Lacto-N-difucohexosa I</b>	$\alpha$ -L-Fuc-(1→2)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)-[ $\alpha$ -L-Fuc-(1→4)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Difucosil lacto-N-hexosa</b>	$\beta$ -D-Gal-(1→4)-[ $\alpha$ -L-Fuc(1→3)-GlcNAc-(1→6)]-[ $\alpha$ -L-Fuc-(1→2)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)]- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Sialil lacto-N-tetrosa a</b>	$\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Sialil lacto-N-tetrosa b</b>	$\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→6)-[ $\beta$ -D-Gal-(1→3)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Diasil lacto-N-tetrosa</b>	$\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)-[ $\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→6)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Sialil fucosil lacto-N-tetrosa</b>	$\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)-[ $\alpha$ -L-Fuc(1→4)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Sialil lacto-N-fucopentosa</b>	$\alpha$ -L-Fuc-(1→2)- $\beta$ -D-Gal-(1→3)-[ $\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→6)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Lacto-N-tetrosa</b>	$\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc

<b>Lacto-N-Fucopentosa III</b>	$\beta$ -D-Gal-(1→4)-[ $\alpha$ -L-Fuc(1→3)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Difucosil-para-lacto-N-hexosa</b>	$\beta$ -D-Gal-(1→3)-[ $\alpha$ -L-Fuc(1→4)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)-[ $\alpha$ -L-Fuc-(1→3)]- $\beta$ -D-GlcNAc(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc
<b>Sialil lacto-N-tetrosa c</b>	$\alpha$ -D-Neu5Ac-(2→6)-[ $\beta$ -D-Gal-(1→4)]- $\beta$ -D-GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc

### Oligosacáridos fucosilados

Según estudios los oligosacáridos de leche humana, especialmente los fucosilados protegen a los infantes de los microorganismos patógenos. Se ha reportado que algunos oligosacáridos fucosilados inhiben la adhesión de *E. coli* enteropatogénica y de otros géneros invasivos a las células epiteliales (Ruíz *et al.*, 1992).

Se sabe que los oligosacáridos inhiben la unión de *Campylobacter jejuni* y de la enterotoxina de *E. coli* a las células anfitrión por medio de mecanismos de adherencia, con lo cual evitan la proliferación y protegen al recién nacido y al lactante de enfermedades causadas por dichas bacterias (Morrow *et al.*, 2004).

Otra de las evidencias que ha denotado la importancia de los oligosacáridos de leche humana, es que en presencia de estos se ha visto que las bacterias lácticas son capaces de desarrollarse en el intestino humano, mejorando la microbiota intestinal generando beneficios en el infante.

## Efecto directo e indirecto de los oligosacáridos de leche humana

La alimentación de los neonatos con leche humana ha sido identificada como el medio más efectivo para proteger a los niños menores de cinco años frente a infecciones gastrointestinales. La leche contiene una extensa variedad de factores de defensa provenientes del sistema inmune innato, además de los que le confiere la madre.

En los últimos años los oligosacáridos de leche humana han sido altamente estudiados por los beneficios que aportan a la salud. Se han estudiado principalmente dos efectos; directo o anti-infeccioso, e indirecto o prebiótico, (Domínguez *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, de manera directa los oligosacáridos bloquean la adhesión de microorganismos patógenos evitando infecciones intestinales, y de manera indirecta se favorece la bifidogénesis, es decir se incrementa la concentración de lactobacilos y bifidobacterias componentes principales de la microbiota intestinal, de manera que también permite excluir a patógenos del tracto gastrointestinal (Fig. 4).

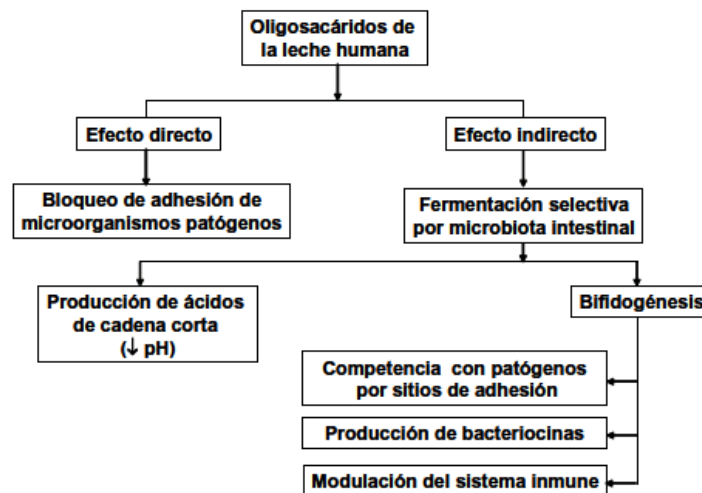


Figura 4. Diagrama del efecto protector de los oligosacáridos de leche humana (Domínguez *et al.*, 2009).

## Efecto prebiótico de los oligosacáridos de leche humana

Se define a un prebiótico como un alimento no digerible, que estimula selectivamente el crecimiento o la actividad de bacterias en el colon, beneficiando la salud del anfitrión (*Gibson, 1995 y 2004*).

Para que un alimento pueda considerarse como prebiótico deberá presentar las características que se enlistan a continuación (*Roberfroid, 2007*):

- a) Resistencia a la digestión en el intestino delgado
- b) Fermentación parcial por bacterias en el intestino grueso
- c) Estimulación selectiva de la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el intestino grueso

Los oligosacáridos de leche humana son considerados como prebióticos. Se sabe que los prebióticos estimulan selectivamente el crecimiento de *bifidobacterias* y *lactobacilos*, productores de sustancias inhibitoras del crecimiento y supervivencia de patógenos (*Gibson et al., 1995, Gibson 2004, Jenkins et al., 1999*).

La fermentación parcial de los oligosacáridos por parte de las *bifidobacterias* produce ácidos grasos de cadena corta, como butirato, propionato, L-lactato y acetato. Los tres primeros favorecen el crecimiento y la diferenciación de células epiteliales *in vivo*. El butirato constituye una importante fuente energética para el colonocito (*Gibson, 2004*).

La microbiota intestinal evoluciona durante los primeros años de vida hasta constituirse de manera estable. Se ha observado que la microbiota persiste hasta una etapa adulta, por ello es importante establecer una microbiota intestinal bifidogénica desde la etapa de lactancia.

## **Efecto anti-infeccioso**

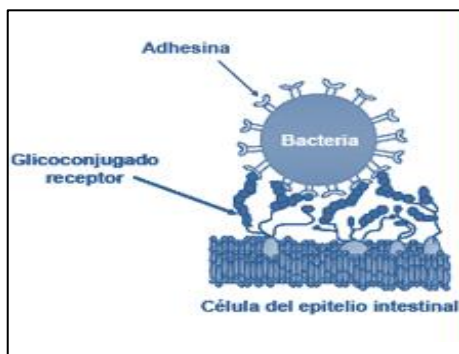
Las enfermedades diarreicas infecciosas constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad de los niños recién nacidos, no solo en países en vías de desarrollo sino también en áreas desarrolladas (*Coppa et al., 2006*); tales infecciones del tracto gastrointestinal son causadas por una amplia variedad de enteropatógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos (*Coppa et al., 2006*). Sin embargo, la lactancia humana ofrece protección con diferentes mecanismos contra la diarrea debido a la presencia de diversos componentes presentes en la leche humana (*Howie et al., 1990, Morrow et al., 1999*); las cuales incluyen oligosacáridos (*Morrow et al., 2005*) además de inmunoglobulinas, citoquinas, prolactina, leucocitos, lactoferrina y lisozimas (*Cervera, 1994*).

Durante el primer año de vida los lactantes necesitan una protección adicional frente a patógenos, debido a que presentan un mayor pH gástrico y a la inmadurez de su sistema inmune. Varios estudios han demostrado que existe una mayor resistencia a las infecciones gastrointestinales, respiratorias y urinarias en los niños alimentados con lactancia natural frente a los que consumen fórmulas infantiles (*Feachem-Adlerberth et al., 1990*).

Los oligosacáridos de la leche humana (OLH) han tomado gran importancia en la investigación, pues se sabe que tienen un efecto anti-infeccioso, ya que actúan como ligando competitivo para bacterias, hongos, virus y protozoos inhibiendo la colonización e infecciones intestinales (*Newburg, 2000*).

Los oligosacáridos ejercen un efecto anti-infeccioso a través de 2 mecanismos: inhibiendo la colonización y el crecimiento de patógenos, ya que actúan interrumpiendo las interacciones adhesina-receptor (Figura 5 y 6), y ejerciendo un efecto prebiótico, es decir favoreciendo el desarrollo de algunas bacterias benéficas para el individuo.

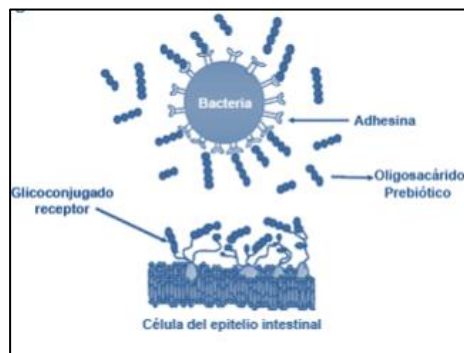
Lo anterior ha resultado útil con algunos oligosacáridos fucosilados solubles que inhiben por competición la unión de patógenos a los receptores de las células intestinales, ya que pueden actuar como análogos de éstos y por lo tanto proteger a los recién nacidos de enfermedades entéricas (Newburg et al 2005).



*Figura 5. Reconocimiento de adhesinas bacterianas a los receptores oligosacáridos (Domínguez et al.,2009)*

Estos oligosacáridos también proveen el sustrato para bacterias del colon del infante y por lo tanto contribuyen a las diferencias que existen en el pH y la microbiota fecal de niños alimentados por leche humana y niños alimentados con fórmula maternizada (Kunz, et al., 2014).

La especificidad de un patógeno por un tipo celular está determinada por la presencia de oligosacáridos apropiados en la membrana celular, la fuerza de unión y el número de uniones patógeno/célula, estos receptores son altamente específicos, sin embargo, las interacciones son débiles, de tal modo, los OLH pueden desprender a las bacterias de las membranas celulares (Brand et al., 1995).



*Figura 6. Diagrama de la actividad inhibitoria de oligosacáridos (análogos a glicanos receptores) como inhibidores de adhesión bacteriana (Domínguez et al., 2009)*

## Estudios relacionados

Anteriormente se ha estudiado el efecto de los oligosacáridos de leche humana en la inhibición de la adherencia en cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y uropatogénica (UPEC) sobre tejidos celulares (Martín-Sosa *et al.*, 2002). En este estudio se observó que las adhesinas de estos patógenos reconocieron a los oligosacáridos que contienen galactosa y ácido siálico (Ofek 1990, Sharon 2006).

En otros estudios se ha demostrado ya, el papel de la fucosa como inhibidora de adhesión de la toxina termoestable de *E. coli* a los receptores intestinales (Crane *et al.*, 1994).

También se ha demostrado la importancia de los oligosacáridos fucosilados en la prevención de diarrea en infantes causada por *Campylobacter jejunii*, calcivirus y ETEC (Morrow *et al.*, 2004).

Así los oligosacáridos derivados de la leche humana han mostrado que tienen actividad anti-adhesiva contra varios patógenos (Coppa *et al.*, 2006; Newburg 2009), siendo especialmente protectora contra enfermedades diarreicas infantiles la fracción de fucosil-glicano (Morrow *et al.*, 2005). La 2'fucosil lactosa bloqueó *in vitro* la unión del enteropatógeno *Campylobacter jejuni* al antígeno H (O) del grupo sanguíneo expresado en la superficie de las células epiteliales, inhibiendo la infección por *Campylobacter in vivo* (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003). La adherencia localizada de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) fue inhibida por tetrasacáridos y pentasacáridos fucosilados, lo que sugiere un papel de estos azúcares como sitios de unión (Cravioto *et al.*, 1991).

Lane *et al.* (2012) desarrollaron un método para detectar la interacción de las células de bacterias con algunos de los oligosacáridos que se encuentran en la leche de vaca. Ya se había probado esta interacción bacteria-carbohidrato, con líneas celulares sin embargo, este método permite de manera más rápida encontrar estas interacciones y asociarlas estructuralmente. De este estudio se

encontró que existe interacción de las células de *E. coli* con los oligosacáridos siliados, principalmente: 3´sialil lactosa, disialil lactosa y 6´sialil lactosamina.

Recientemente El-Hawiet *et al.* (2014) realizaron un estudio más preciso de reconocimiento de oligosacáridos de leche humana por exotoxinas de algunas bacterias patógenas en las que se encontró un reconocimiento de algunos oligosacáridos como 2´fucosil-lactosa, lacto-N-Tetraosa, lacto-N-fucopentaosa (I, II y III), con lo que se ha dejado clara la importancia de estos oligosacáridos y en general, la importancia de la lactancia humana para proteger a los infantes de enfermedades y específicamente evitar enfermedades gastrointestinales causadas por *E. coli*. Sin embargo, la disponibilidad de OLH es extremadamente limitada ya que únicamente se sintetizan en la leche de la madre durante la etapa de lactación, por esta razón se han buscado alternativas para sintetizar estos compuestos a fin de ofrecer mayor disponibilidad.

### **Colonización del intestino del recién nacido**

Se ha descrito que entre las primeras 24 a 72 horas pasadas del parto, el lumen del colon es colonizado por enterobacterias provenientes de la microbiota fecal humana. Dado que el lumen en este punto contiene una gran cantidad de oxígeno, estas bacterias lo consumen y generan un ambiente anaerobio facultativo, es decir, crecen en presencia o ausencia de oxígeno. Este ambiente resulta ser favorable para las bacterias anaerobias, que se vuelven microbiota predominante en los niños alimentados con leche humana. Dentro de estas bacterias se encuentran asociados los lactobacilos y bifidobacterias, además de las enterobacterias (*Brunser, 2013*).

Como se mencionó con anterioridad, se ha postulado que el inicio de la colonización de los neonatos por bacterias fecales de origen materno, y por la microbiota de la leche humana, otorga beneficios inmunológicos al lactante. Además, bacterias de la microbiota intestinal potencian la calidad de la función de barrera de la mucosa intestinal así como la producción de mucina por las células



caliciformes, estimula la síntesis de péptidos con actividad antimicrobiana (Brunser, 2013).

## **Familia Enterobacteriaceae**

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se clasifican principalmente en dos grupos; en el primero se encuentran los microorganismos que colonizan habitualmente el tubo digestivo o que se asocian en forma más notoria a infecciones humanas. Aunque muchas de las bacterias de esta familia que causan infecciones en el ser humano forman parte de la microbiota gastrointestinal normal, hay excepciones como el bacilo de la peste *Yersinia pestis*. En el segundo grupo se encuentran géneros que pueden colonizar a los seres humanos pero rara vez se asocian con infecciones humanas o que en la mayoría de los casos reconocen como habitantes del medio o colonizadores de otros animales.

La mayoría de los miembros de la familia Enterobacteriaceae son microorganismos que fermentan la glucosa, y que con raras excepciones reducen los nitratos a nitritos. Además, salvo *Shigella dysenteriae* de tipo 1, todos los integrantes producen catalasa.

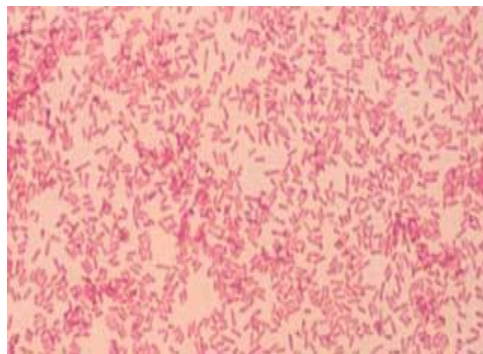
Estos microorganismos habitan en una amplia variedad de nichos que incluyen el tubo digestivo del ser humano y de otros animales y en diversos sitios ambientales. En el caso de las especies que suelen colonizar a los seres humanos pueden producirse infecciones cuando las cepas bacterianas propias de un paciente (es decir las cepas endógenas) establecen infecciones en un sitio del cuerpo que por lo general es estéril.

Especies como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolitica* solo habitan en el intestino cuando causan infección y se adquieren por la ingestión de alimentos o agua contaminados. Este también es el modo de transmisión de los diversos tipos de *E. coli* que causan infecciones gastrointestinales.

## ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo (Figura 7), que fermenta produciendo ácido y gas a partir de la glucosa, lactosa y otros azúcares. Produce reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer.

Se clasifica en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su lipopolisacárido, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (como capsulares, o fimbriales) han sido empleados para su clasificación y/o identificación. *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el anfitrión una relación estable de mutuo beneficio (*Drasar y Hill, 1974*). Como integrante de la microbiota normal del hombre y de muchos animales, se le considera indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros microorganismos similares, agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".



*Figura 7. Morfología de Escherichia coli.*

Entre las cepas causantes de diarrea en neonatos se encuentran *E. coli* Enteropatógena (EPEC).

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con

polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria (Eslava, 1994).

La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas cuya información genética está codificada en un plásmido EAF (EPEC factor de adherencia) y de algunos genes cromosomales (Girón, 1994).

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes (Rodríguez, 2002). La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de personal que interviene en la manipulación de alimentos.

### **Mecanismos de patogenicidad de *Escherichia coli***

*E. coli* presenta diversos mecanismos de patogenicidad, sin embargo, uno de los principales y con el que relacionamos el presente estudio es el de adherencia, que esta mediado por unas estructuras llamadas fimbrias o pilis. Así la bacteria contacta la superficie de la célula anfitrión. Normalmente, la proteína localizada en el extremo de la fimbria es la adhesina, que se adhiere a un receptor de la célula anfitrión constituido por regla general por residuos de carbohidratos de glucoproteínas o glucolípidos (Vila, 2008).

La adhesina es la proteína que primero es transportada al exterior y, posteriormente, se establece en el cuerpo de la fimbria por adición secuencial de la proteína mayoritaria. Ciertas bacterias Gram negativas poseen proteínas localizadas en la membrana externa que tienen un papel importante en la adherencia, se trata de las denominadas adhesinas afimbriadas. En algunas bacterias, la adherencia a la célula anfitrión se produce en dos pasos. En el primer paso la interacción se realiza mediante la fimbria, y en un segundo paso tiene lugar una unión más intensa en la que, al parecer, intervienen las adhesinas afimbriadas (Vila, 2008).

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la adhesión de distintos monosacáridos que se encuentran presentes en los oligosacáridos de la leche humana a las células de *Escherichia coli*, bajo condiciones del tracto gastrointestinal.

### Objetivos particulares

Evaluar la adhesión de los monosacáridos glucosa, galactosa, fucosa, lactosa e inositol en solución isotónica a células de *Escherichia coli*.

Evaluar la adhesión de oligosacáridos de leche humana (OLH) y OLH defucosilados a células de *Escherichia coli*, bajo condiciones intestinales en pH y temperatura.

Establecer teóricamente el tipo de OLH que se encuentran en las muestras de leche estudiadas y a cuáles de ellos se adhiere *Escherichia coli*.

### Hipótesis de trabajo

Si existe diferencia en la adhesión de *Escherichia coli* a los OLH y OLH defucosilados se comprobará la importancia de la fucosa para la adherencia a microorganismos patógenos.

## METODOLOGÍA

A continuación, se muestran los esquemas del plan de trabajo desarrollado para esta investigación.

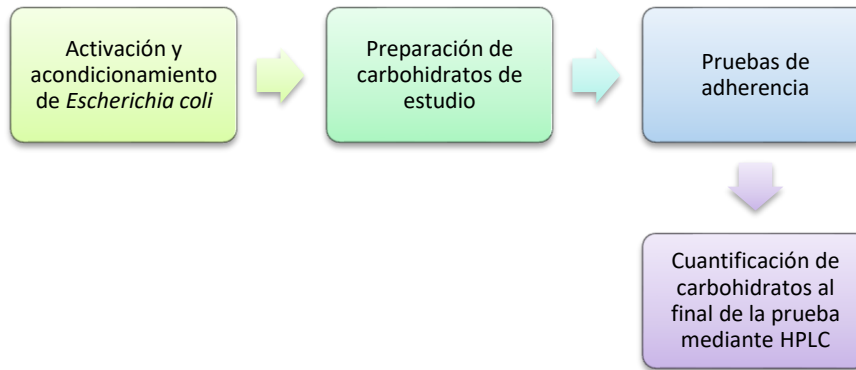


Figura 7. Estrategia experimental para las pruebas de adherencia con carbohidratos.

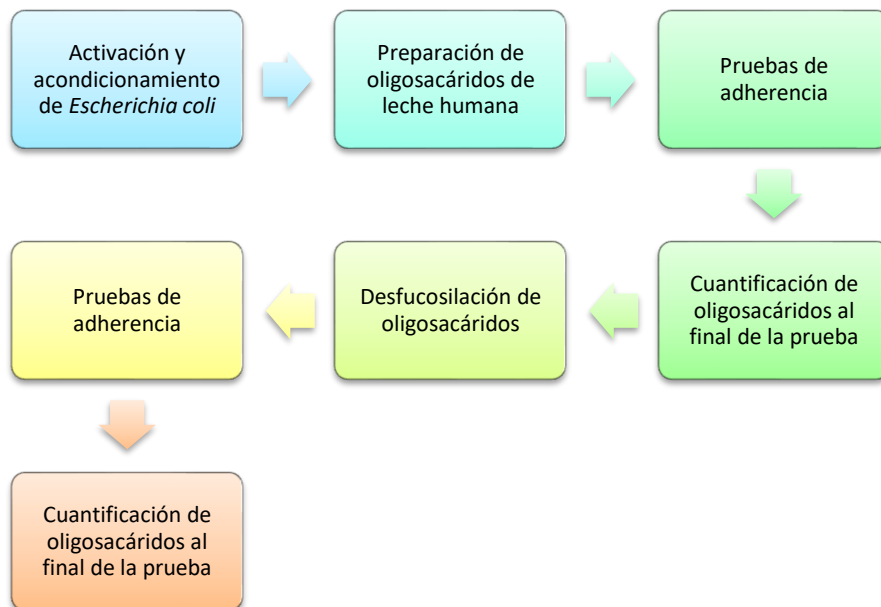


Figura 8. Estrategia experimental para las pruebas de adherencia con oligosacáridos de leche humana.

## Pruebas con carbohidratos

### *Activación y acondicionamiento de Escherichia coli.*

Se inoculó un tubo de caldo nutritivo con 0.5 mL de *Escherichia coli* y se dejó en incubación durante 24 horas a 37°C, bajo condiciones de anaerobiosis.

Transcurrido el tiempo de incubación se resembró en medio de caldo Brain Heart Infusión (BHI) y se incubó durante 24 horas a 37 °C, pasadas las 24 horas de crecimiento en BHI se inocularon 500 µL en un matraz con 90ml de medio BHI y se incubaron durante 3 horas ya que según la curva de crecimiento el microorganismo se encontraría en la fase exponencial. El crecimiento fue monitoreado por absorbancia a 650 nm y cuando se obtuvo un valor de 1.5 este cultivo se utilizó para hacer la prueba de adherencia ya que tenía  $1 \times 10^9$  UFC/mL.

### *Preparación de los carbohidratos de estudio.*

Se preparó solución isotónica con 8.5 g/L NaCl a pH 7 simulando condiciones intestinales (en pH y temperatura), se adicionaron 0.5 mg/mL de cada carbohidrato: fucosa (control positivo), galactosa, glucosa, lactosa, inositol (control negativo).

### *Pruebas de adherencia.*

La cepa de *Escherichia coli* se incubó durante 24 horas a 37 °C, posteriormente se resembró en un medio BHI y se incubó durante 3 horas a 37 °C, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C; se desechó el sobrenadante, se lavó con 100 mL de solución isotónica de NaCl (8.5 g/L) y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 10 minutos, las células se resuspendieron ajustando con solución isotónica para obtener una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL.

Se añadió 1 mL de la suspensión celular en 5 tubos Eppendorf, se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se conservaron en refrigeración. En uno de los tubos al que se etiquetó como *cell 1* se añadió 1 mL de solución de carbohidrato, se resuspendieron las células y se agitó el tubo en el vórtex durante 15 segundos, se mantuvo durante 5 minutos en incubación a una temperatura 37 °C y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo *cell 2* con células, se incubó nuevamente a 37 °C durante 5 min, se centrifugó y se transfirió a un tercer tubo el sobrenadante (*cell 3*), se continuó realizando los pasos anteriores hasta llegar al tubo *cell 5* y pasada la centrifugación de este mismo se colocó el sobrenadante en un tubo Eppendorf y se filtró con membrana de nylon de 0.22 µm (Thermoscientific).

Se siguió con la metodología anterior cambiando la temperatura de incubación a 4 °C y finalmente se cuantificaron mediante HPLC los carbohidratos antes y después de la prueba de adhesión. Se realizaron las pruebas por duplicado.

#### *Cuantificación de carbohidratos mediante HPLC*

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), con una bomba y horno LAB Alliance y detector SOFTA Model 300S ELSD, con columna Hamilton79544 medidas 305 x 7.75mm usando agua desionizada como fase móvil.

Se inyectaron en el HPLC las soluciones estándar de carbohidrato de estudio antes de ser expuestas a las células de *E. coli*, esto para cuantificar lo que se obtuvo en el perfil inicial y poder compararlo con el resultado obtenido en las pruebas de adherencia.

Una vez obtenidos los perfiles se realizó el cálculo de la concentración de carbohidrato, usando curvas patrón para cada carbohidrato conocido.

### ***Purificación de oligosacáridos de leche humana***

La purificación desarrollada por Barrón (2013), se describe a continuación.

Se partió de una muestra de leche humana que fue centrifugada a 10 000 rpm por 40 minutos a 4°C con el fin de eliminar la mayor cantidad de grasa, el sobrenadante se filtró al vacío con fibra de vidrio para retirar los residuos de grasa; se realizó una precipitación de las proteínas con acetona fría a 4° C por 30 minutos, se centrifugó a 10 000 rpm por 30 minutos a 4° C, se evaporó la acetona residual al extracto desproteinizado en campana de extracción con agitación por 2 horas, pasado este tiempo se ajustó el pH a 5.2 con HCl 0.1 M. Para eliminar la lactosa en el extracto desproteinizado se hizo una hidrólisis utilizando  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* a 37° C por 24 horas y se obtuvo lo que se denomina extracto crudo de oligosacáridos.

Los monosacáridos obtenidos (glucosa y galactosa) de la hidrólisis de la lactosa se removieron mediante fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevaliere* por 20 horas a 30° C, y se obtuvieron los oligosacáridos purificados parcialmente.

Para el crecimiento de la levadura se mantuvo durante 24 horas a 30°C en un medio conteniendo 12.5 mg/mL de glucosa, 5 mg/mL de extracto de levadura y 5 mg/mL de sulfato de amonio y se dejó a 30° C por 24 horas, se centrifugó el medio de fermentación a 10 000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se obtuvieron las células que fueron utilizadas para la remoción de los monosacáridos del extracto crudo de oligosacáridos.

Se analizaron los oligosacáridos por HPLC con una columna Rezex RHM-monosacáridos; se utilizó como eluyente agua destilada, desionizada y filtrada, con un flujo de 0.3 mL/min. La columna se mantuvo a una temperatura de 75° C y el detector trabajó con un flujo de nitrógeno 1.5 psi, a una temperatura de 90° C del nebulizador y a 110° C la temperatura de evaporación.



## **Pruebas con oligosacáridos de leche humana**

### *Activación y acondicionamiento de Escherichia coli.*

Las células de *E. coli* se obtuvieron siguiendo la metodología de Activación y acondicionamiento de *E.coli* descrita en la pág 29, correspondiente a las Pruebas con carbohidratos.

### *Preparación de los oligosacáridos de leche humana para las pruebas de adherencia.*

Se utilizó una solución de oligosacáridos de leche humana previamente purificados, que tenían un pH inicial de 3 por lo que se ajustó a 7 para poder realizar las pruebas.

### *Pruebas de adherencia con oligosacáridos de leche humana.*

Las pruebas de adherencia se realizaron de acuerdo a la metodología indicada en la página 29 referente a esta actividad.

Dado que una reducción en la concentración de cada uno de los oligosacáridos encontrados estaría íntimamente relacionada con la adherencia debido a la interacción de las lectinas de *E. coli* con el carbohidrato terminal de cada uno de los oligosacáridos obtenidos, los resultados se reportaron como OHL adherido (%).

## ***Liberación de fucosa de oligosacáridos de leche humana empleando fucosidasa.***

*Fucosidasa de Xanthomonas manihotis*

La  $\alpha$  [1-2] fucosidasa es una enzima exoglicosidasa altamente específica que cataliza la hidrólisis de enlaces  $\alpha$  [1-2] relacionados con los residuos L-fucopiranosil provenientes de oligosacáridos (Wong et al., 1996) (Figura 5).

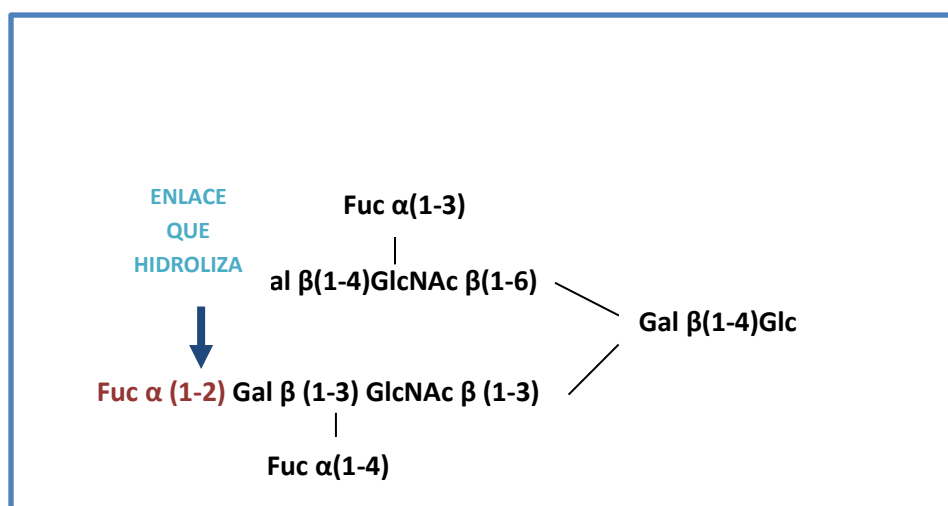


Figura 9. Especificidad de la fucosidasa de *Xanthomonas manihotis*

Se preparó una reacción colocando 5 mL de oligosacáridos purificados en un tubo de ensayo y se añadió 50  $\mu$ L (20,000 U/mL) de fucosidasa de *X. manihotis*, se incubó durante 24 horas a 200 rpm con una temperatura de 37 °C y a un pH de 6, condiciones necesarias para llevar a cabo esta reacción.

Posterior al tiempo de incubación se inyectó la solución anterior de oligosacáridos en HPLC para identificar los OLH defucosilados tras la reacción y continuar con las pruebas de adherencia.

### *Pruebas de adherencia con oligosacáridos defucosilados.*

Una vez identificada la reacción de hidrólisis mediante HPLC, se procedió con las pruebas de adherencia con los oligosacáridos sin fucosa, siguiendo la metodología descrita en la página 29 en la sección de pruebas de Adherencia.

### *Cuantificación de oligosacáridos defucosilados mediante HPLC.*

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), con una bomba y horno LAB Alliance y detector SOFTA Model 300S ELSD, con columna para oligosacáridos (00P-0137-N0 Rezex RNO-Oligosaccharide) Phenomenex® usando agua desionizada como fase móvil.

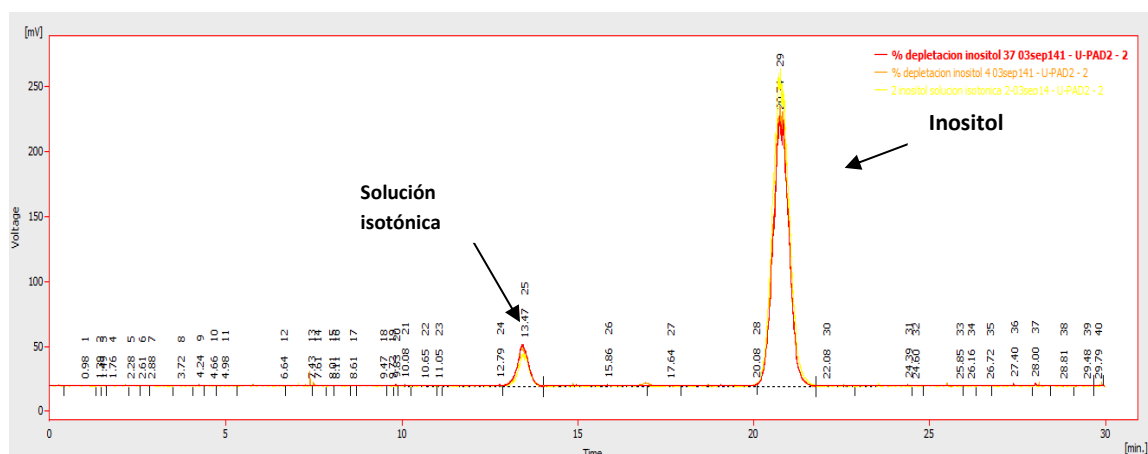
Una vez obtenidos los perfiles de los oligosacáridos al inicio y al final de la prueba de adherencia se calcularon las concentraciones de cada uno de los oligosacáridos usando una curva patrón de rafinosa (trisacárido)

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### *Pruebas de adherencia de Escherichia coli con los carbohidratos.*

Se realizó una prueba de adherencia de *E. coli* con inositol, como control negativo porque no se ha reportado que exista un reconocimiento de este por las lectinas de *E. coli*.

En el cromatograma 1 se puede observar que la concentración de inositol, al principio (línea amarilla) y al final de la prueba de adherencia (línea roja) no cambia, este polialcohol es un sustrato no fermentable por *E. coli* y tampoco presentó una interacción con el microorganismo.

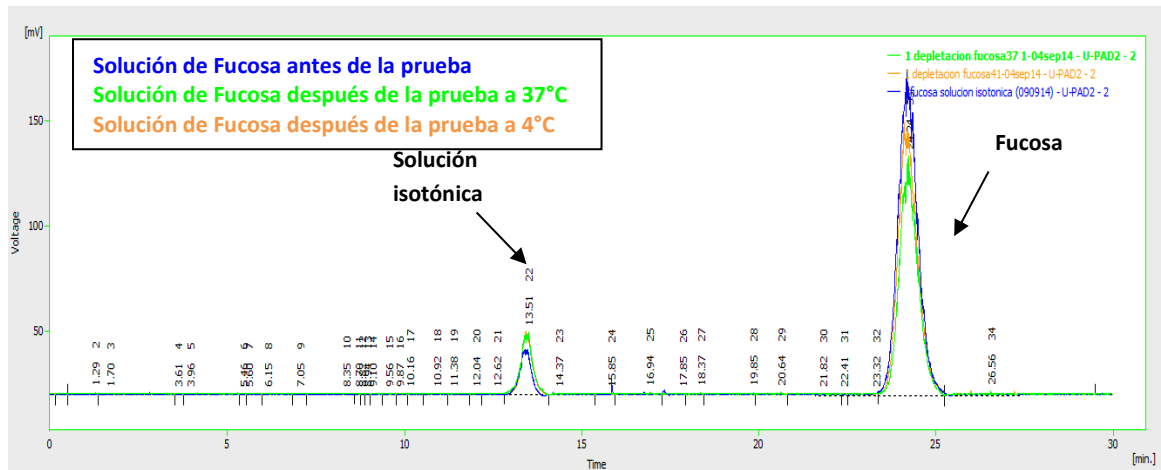


*Cromatograma 1. Prueba de adherencia con el inositol (control negativo)*

Posteriormente se realizaron pruebas de adherencia empleando monosacáridos que se encuentran en las estructuras de los oligosacáridos de la leche humana.

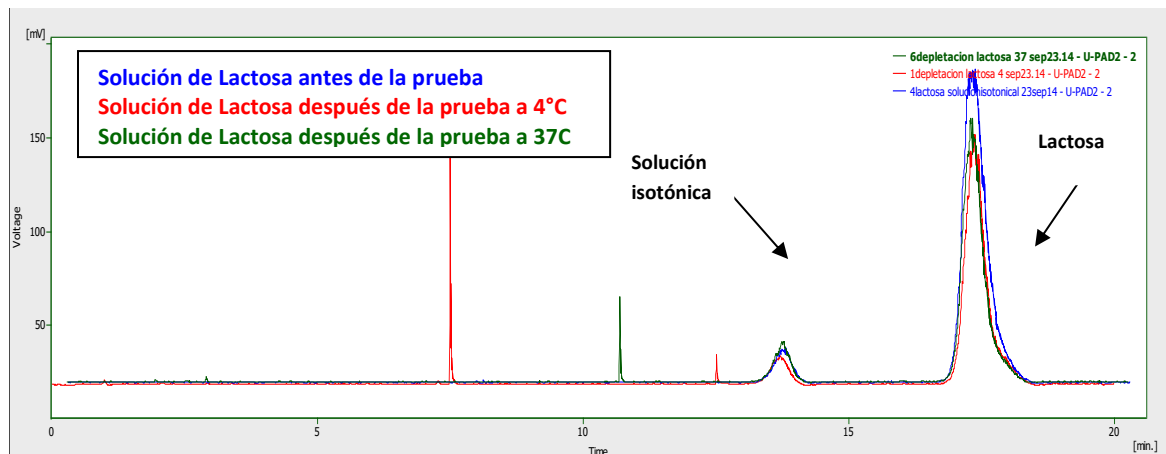
En el caso de fucosa (Cromatograma 2) se puede observar que, si hay una disminución de la concentración, lo cual nos puede indicar que existe “adhesión” del carbohidrato a las células de *E. coli*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente con los oligosacáridos fucosilados de leche humana que son capaces de detener la unión de las enterotoxinas de *E. coli* a las células (Brand et al., 1995).



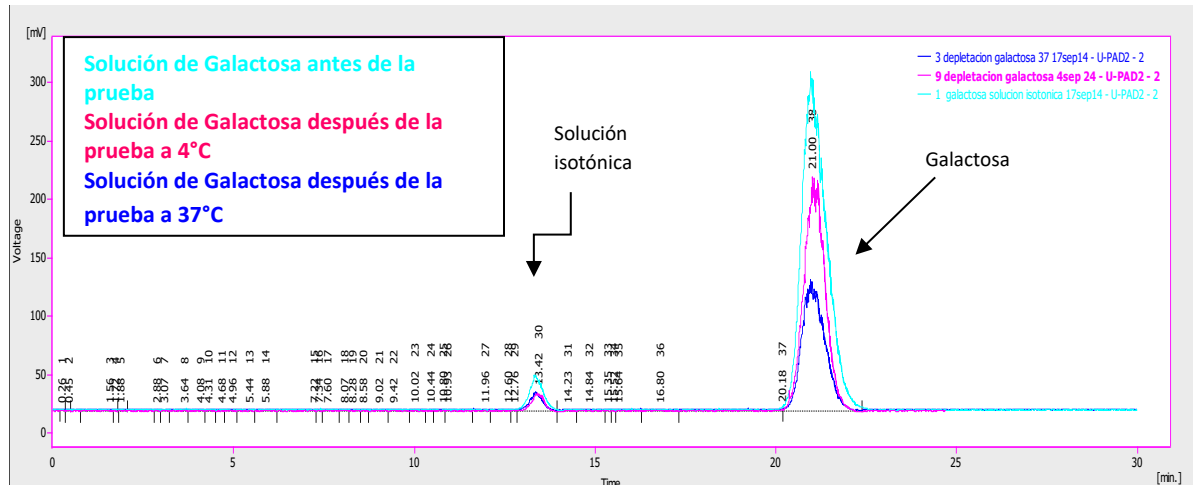
Cromatograma 2. Prueba de adherencia con fucosa (control positivo)

Respecto a la lactosa (Cromatograma 3) se puede observar una disminución de la concentración. *E. coli* también utiliza este carbohidrato como sustrato fermentable, sin embargo al ser poco el tiempo de exposición, no es viable el consumo de éste disacárido, lo que nos indica una relación con la adhesión a las células de este microorganismo, probablemente una interacción estructural, es decir, un reconocimiento de la galactosa componente de la lactosa, pues en la prueba de adherencia de galactosa, descrita a continuación se ha visto una reducción importante en la concentración que podría evidenciar interacción.



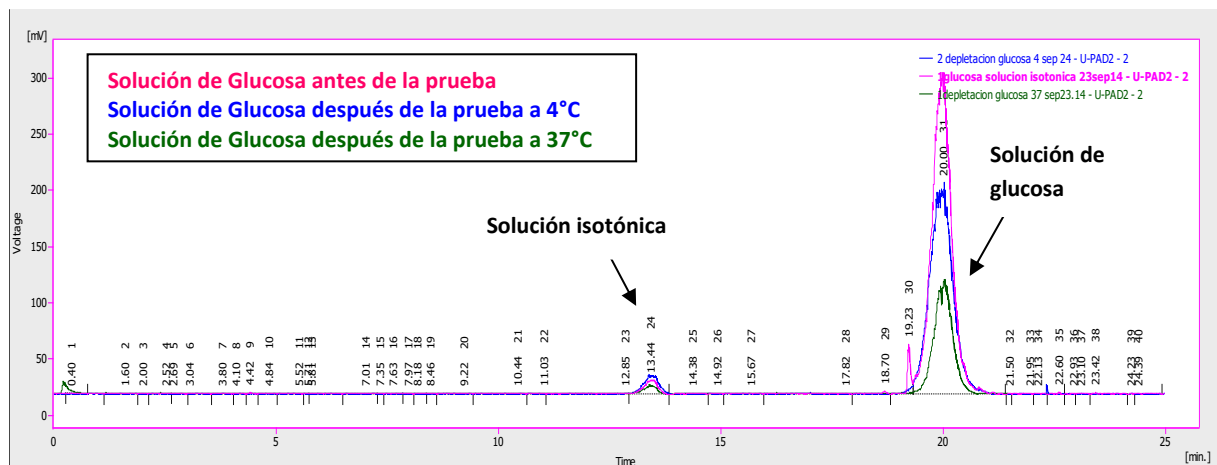
Cromatograma 3. Prueba de adherencia con lactosa

Para la prueba de galactosa (Cromatograma 4), se observa claramente una disminución de la concentración, lo cual puede deberse a una posible adhesión de este carbohidrato con *E. coli*. Otros investigadores han reportado que hay una interacción entre la galactosa y algunos patógenos lo que impide la adhesión de estos a las células epiteliales (Gudiel y Goñi, 2001).



Cromatograma 4. Prueba de adherencia con galactosa

Para las pruebas de glucosa (Cromatograma 5) se observa una disminución significativa de la concentración, sin embargo hasta el momento no existe información asociada a la adhesión de este carbohidrato con *E. coli*, por lo que parece ser un resultado interesante. En estudios de reconocimiento de azúcares por células bacterianas, se encuentra reportado el reconocimiento de glucosa entre otros carbohidratos por bacterias entéricas y levaduras (Biasoli et al., 2003).



Cromatograma 5. Prueba de adherencia con glucosa

Esto resulta interesante, pues los oligosacáridos que presenten un extremo terminal de glucosa podrían ser reconocidos por las células de *E. coli*, ayudando así a evitar la colonización de este patógeno al intestino del neonato.

En la tabla 3 y gráfico 1 se reporta la disminución de la concentración de cada uno de los carbohidratos expuestos a las células de *E. coli*, donde se observa una variación respecto a la temperatura, siendo mayor la adherencia a 37 °C, los resultados obtenidos a 4 °C fueron diferentes probablemente porque a esa temperatura el reconocimiento de las glicoproteínas a los carbohidratos no se vio favorecido. Se puede decir que bajo condiciones intestinales como las trabajadas durante este experimento, se obtendrá un perfil similar ya que se simulan las mismas condiciones de éste en pH y temperatura (37 °C, pH 7) intestinales.

Descartamos la posibilidad de fermentación de estos carbohidratos por *E. coli*, porque aunque son carbohidratos fermentables, a la temperatura de 4 °C y el tiempo de exposición a ellas fue muy corto y en cada recambio celular se tenían las células en refrigeración para reducir la posibilidad de que se metabolizaran los carbohidratos de estudio o que aumentara el número de células en cada recambio.

*Tabla 3. Cuantificación de los carbohidratos antes y después de la exposición con Escherichia coli*

<b>Carbohidrato</b>	<b>Concentración inicial (mg/mL)</b>	<b>Concentración final a 37°C (mg/mL)</b>	<b>Concentración final a 4°C (mg/mL)</b>
<b>Fucosa (control+)</b>	0.5	0.331±0.027	0.403±0.050
<b>Galactosa</b>	0.5	0.194±0.004	0.327±0.001
<b>Glucosa</b>	0.5	0.308±0.027	0.427±0.009
<b>Lactosa</b>	0.5	0.380±0.015	0.380±0.023
<b>Inositol (control -)</b>	0.5	0.500±0.001	0.500±0.001

En el gráfico 1 se reporta la adherencia de cada carbohidrato durante la prueba, y se asocia a la interacción del carbohidrato de manera directa con las células de *E. coli*, que como se mencionó al inicio presentan una interacción carbohidrato-proteína entre las lectinas, también llamadas adhesinas y los glicanos de los receptores celulares; ya que estos carbohidratos presentan similitud con esos receptores, se puede decir que están interaccionando.

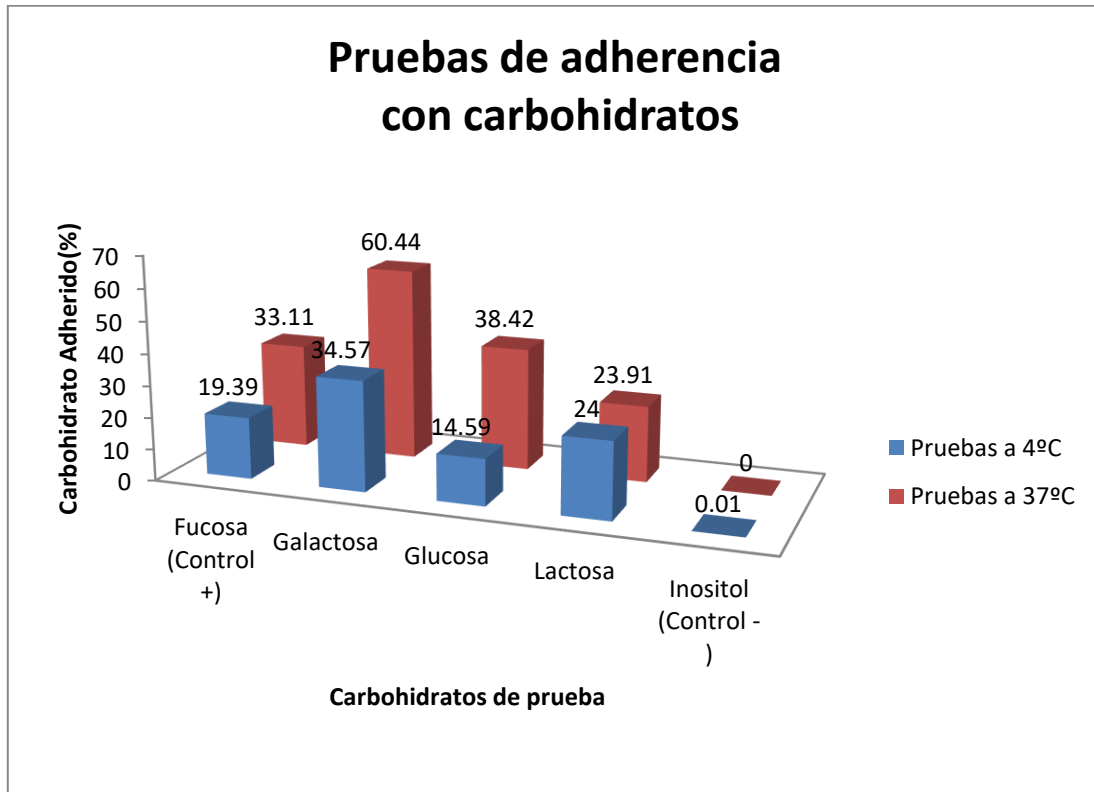


Gráfico 1. Adherencia de los carbohidratos a *Escherichia coli* a diferentes temperaturas

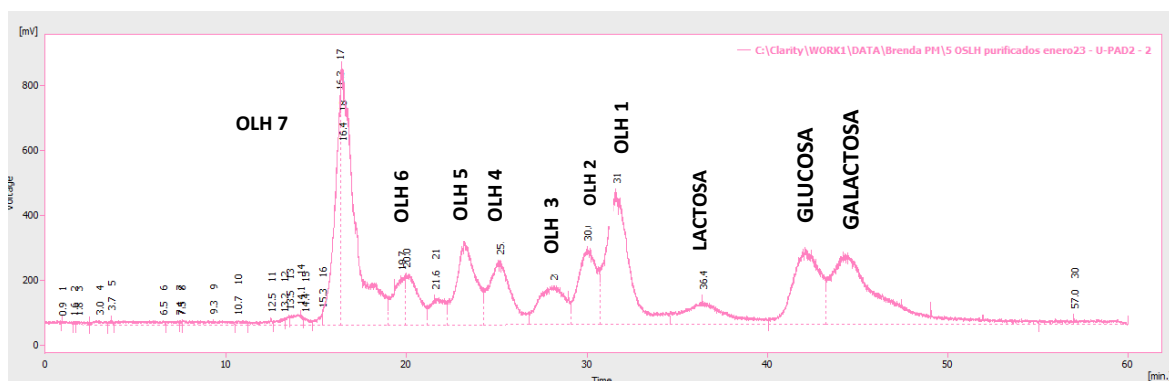


## Pruebas con oligosacáridos de leche humana

### Cuantificación de OLH

Se tomó una muestra de oligosacáridos purificados de leche humana (del primer mes de lactancia) y se inyectó en el equipo de HPLC para identificar los picos característicos.

Se inyectaron estándares de monosacáridos que se encuentran frecuentemente en la leche humana para poder estimar la composición de la muestra y clasificarlos por su grado de polimerización de acuerdo a su tiempo de retención. Al ser una columna de exclusión molecular, la muestra eluye por modo decreciente de su tamaño molecular, de tal manera que los monosacáridos se presentan en tiempos de 40-50 minutos, que los de mayor grado de polimerización. Se inyectó también un estándar de lactosa presentando un tiempo de retención cercano al minuto 36, por lo que se estableció que en ese tiempo de retención aparecerán los disacáridos. Se tomó como referencia una tabla en la cual se enlistan algunos oligosacáridos con sus tiempos de retención (Anexo). Partiendo de este principio en el Cromatograma 6 las señales que aparecen del minuto 16 y antes del minuto 36 serán estructuras de grado de polimerización 3 en adelante. De acuerdo con ello, los oligosacáridos se etiquetaron como OLH 1, OLH 2, OLH 3, OLH 4, OLH 5, OLH 6 y OLH 7, siendo OLH 7 el que se estima tenga mayor grado de polimerización y OLH 1 el que tenga menor grado de polimerización.



Cromatograma 6. Perfil de oligosacáridos de leche humana purificados

Tras inyectar en el equipo de HPLC la solución de oligosacáridos de leche humana se calculó la concentración de oligosacáridos que tenía la muestra, para la estimación de la concentración de los oligosacáridos se tomaron en cuenta las curvas patrón de rafinosa (trisacárido) y se calculó la concentración (mg/mL) de cada uno de los oligosacáridos de estudio (Tabla 4) tomando en cuenta que esto es una aproximación, ya que no contamos con estándares de oligosacáridos de leche humana en el laboratorio. Así mismo se propone el grado de polimerización de los oligosacáridos por la comparación de los tiempos de retención con los oligosacáridos estándar (Anexo).

*Tabla 4. Estimación de la concentración y grado de polimerización de oligosacáridos de leche humana*

<b><i>Oligosacárido</i></b>	<b><i>Tiempo de retención (min)</i></b>	<b><i>Concentración estimada (mg/mL)</i></b>	<b><i>Grado de polimerización estimado</i></b>
<b><i>OLH 1</i></b>	31.85	4.73±0.036	3
<b><i>OLH 2</i></b>	30.27	1.88±0.072	3
<b><i>OLH 3</i></b>	28.19	1.29±0.050	4
<b><i>OLH 4</i></b>	25.39	1.85±0.198	5
<b><i>OLH 5</i></b>	23.41	2.92±0.245	6
<b><i>OLH 6</i></b>	20.21	1.81±0.005	>6
<b><i>OLH 7</i></b>	16.34	9.15±0.986	>6

Se conocen más de 130 oligosacáridos sin embargo los que se encuentran comúnmente en el primer mes de lactancia, son solo algunos, como lo han reportado Kunz (2000) y *El-Hawiet et al* (2014). Tomando como referencia los estudios anteriores y de acuerdo al grado de polimerización estimado se proponen las estructuras para cada uno de los oligosacáridos estudiados (Tabla 5).

Tabla 5. Estructuras de oligosacáridos de importancia en la leche humana

Grado de polimerización	Estructura reportada*	Oligosacárido de la muestra de estudio	Tipo de enlace de fucosa
3	2-fucosil lactosa	OLH 1	$\alpha(1\rightarrow2)$
	3-fucosil lactosa	OLH 2	$\alpha(1\rightarrow3)$
	3-sialil lactosa		-
	6-sialil lactosa		-
4	Difucosil lactosa	OLH 3	$\alpha(1\rightarrow2)$
	3-sialil 3-fucosil lactosa		$\alpha(1\rightarrow3)$
	Lacto-N-tetraosa		-
	Lacto-N-neotetraosa		-
5	Lacto-N-fucopentaosa I	OLH 4	$\alpha(1\rightarrow2)$
	Lacto-N-fucopentaosa II		$\alpha(1\rightarrow4)$
	Sialilacto-N-tetraosa a		-
	Sialilacto-N-tetraosa b		-
	Lacto N fucopentaosa III		$\alpha(1\rightarrow3)$
	Sialil-lacto-N-tetraosa c		-
6	Lacto-N-difucohexosa	OLH 5	$\alpha(1\rightarrow2)/\alpha(1\rightarrow4)$
	Disialilacto-N-tetraosa		-
	Sialilfucosillacto-N-tetraosa		$\alpha(1\rightarrow4)$
	Sialilacto N fucopentaosa V		$\alpha(1\rightarrow2)$
>6	Difucosillacto-N-hexosa	OLH 6 OLH 7	$\alpha(1\rightarrow3), \alpha(1\rightarrow4)$
	Difucosil-para-lacto-N-hexaosa		$\alpha(1\rightarrow3)$

\*El Hawiet et al., 2014

## Pruebas de adherencia con OLH

Una vez obtenida la concentración estimada de oligosacáridos se realizó la prueba de adherencia con *E. coli*, esta se calculó determinando la reducción de la concentración de cada uno de los OHL tras observar cambios en las áreas de los picos pertenecientes a los OHL y el valor obtenido se reportó como oligosacárido adherido.

En la tabla 6 se reporta la adherencia de los oligosacáridos de la leche humana a *E. coli*, como se puede observar se obtuvo adherencia con todos los oligosacáridos vistos en el cromatograma, lo cual se puede atribuir a la presencia de fucosa, como se muestra en la Tabla 5. Particularmente el oligosacárido OLH 1 reduce su concentración en un 23% lo que nos indica que esta cifra es la que se adhiere a las células de *E. coli*, en estudios anteriores se ha hecho énfasis en la importancia de los oligosacáridos fucosilados y su efecto protector a los infantes. (*Prasoon et al., 2000*).

Los OLH 2 y 5 clasificados con grado de polimerización 3 y 6 respectivamente, presentaron interacción importante con las células de *E. coli*. Si se relacionan estos resultados a los oligosacáridos citados en la Tabla 5, observamos que la adherencia puede estar relacionada con cualquiera de los oligosacáridos mencionados. Dado que no podemos definir sobre qué oligosacárido existe este reconocimiento debido a falta de otras técnicas analíticas que revelen la composición estructural, podemos asociarlo de acuerdo al estudio desarrollado por *Hawiet et al., 2014*, quien ha reportado que existe un reconocimiento de las células de *E. coli* por los siguientes oligosacáridos: lacto-N-difucohexaosa, sialilfucosillacto-N-tetraosa, sialillacto-N-fucopentaosa V, mismos que se encuentran dentro de los oligosacáridos probados. Por otro lado también se ha reportado interacción de *E. coli* con otros oligosacáridos fucosilados de grado de polimerización 4 como son: 3´sialil-3-fucosil lactosa y difucosil-lactosa. Con esta información podemos resaltar la importancia de oligosacáridos con fucosa en la interacción con las células de *E. coli* para evitar la adhesión de patógenos en el intestino del neonato.

Se descartó la asociación del ácido siálico con la adherencia de células de *E. coli*, pues estudios han reportado que durante el período de lactancia neonatal, la producción de ácido siálico puede no ser suficiente para satisfacer las necesidades de todos los tejidos en el recién nacido, si bien el ácido podría servir como un nutriente condicionalmente esencial para el recién nacido de lactancia (*Brand-Miller, 2001*), se ha visto mayormente relacionado con el neurodesarrollo y la capacidad cognitiva que por ejercer efecto protector contra infecciones intestinales.

Esto sugiere que los oligosacáridos fucosilados pudieran presentar una interacción potencial a las células de *E. coli*, lo que se confirma su efecto protector.

Para calcular la adherencia de los OHL, se consideraron las áreas de cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma, si bien es una solución, al utilizar la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, el perfil que se obtiene en el cromatograma separa la solución en los diferentes grados de polimerización, clasificados así por su tiempo de retención.

Tabla 6. Adherencia de los oligosacáridos de leche humana a *Escherichia coli*

<i>Oligosacárido</i>	<i>Grado de polimerización estimado</i>	<i>Adherencia (%)</i>
<i>OLH 1</i>	3	23.37
<i>OLH 2</i>	3	25.31
<i>OLH 3</i>	4	19.63
<i>OLH 4</i>	5	17.64
<i>OLH 5</i>	6	25.87
<i>OLH 6</i>	>6	9.33
<i>OLH 7</i>	>6	14.83

## Cuantificación de oligosacáridos defucosilados

Se empleó la fucosidasa de *Xanthomonas manihotis* para hidrolizar la fucosa [ $\alpha$ -L-fuc-(1 $\rightarrow$ 2)] presente en los oligosacáridos de la leche humana, en la Tabla 7 se reporta la concentración estimada para cada oligosacárido.

Como se observa en la Tabla 7, el oligosacárido 1 (OLH1) desaparece después de la hidrólisis con la fucosidasa, la cual hidroliza el enlace  $\alpha$  [1-2] presente en los oligosacáridos, por lo que definimos que el OLH 1 corresponde a 2 fucosil-lactosa, y esto también se comprueba con el hecho de que la concentración de lactosa aumentó después del tratamiento con la fucosidasa. Bajo este supuesto la concentración de fucosa debería aumentar, sin embargo, dado que utilizamos una columna exclusiva para oligosacáridos no logramos visualizar la concentración del monosacárido fucosa en el cromatograma.

Tabla 7. Concentración de oligosacáridos defucosilados después de la hidrólisis con fucosidasa.

Oligosacárido	Grado de polimerización	Concentración de oligosacáridos (mg/mL)	Concentración de oligosacáridos defucosilados (mg/mL)
Lactosa	2	0.10 $\pm$ 0.009	0.70 $\pm$ 0.301
OLH 1	3	4.73 $\pm$ 0.036	0
OLH 2	3	1.88 $\pm$ 0.072	1.95 $\pm$ 0.252
OLH 3	4	1.29 $\pm$ 0.050	1.34 $\pm$ 0.071
OLH 4	5	1.85 $\pm$ 0.198	1.78 $\pm$ 0.270
OLH 5	6	2.92 $\pm$ 0.245	1.49 $\pm$ 0.190
OLH 6	>6	1.81 $\pm$ 0.005	1.68 $\pm$ 0.652
OLH 7	>6	9.15 $\pm$ 0.986	9.70 $\pm$ 0.089

Se encuentran también algunos cambios perceptibles en las concentraciones de algunos oligosacáridos, tal es el caso de OLH 4 el cual disminuye su concentración como consecuencia de la defucosilación de algún oligosacárido con fucosa enlazada  $\alpha$ 1-2 (por ejemplo, Lacto-N-fucopentaosa I) generándose un

pentasacárido (Lacto-N-Tetraosa), pentasacárido que se encuentra dentro de los presentes en esta fase de lactancia, (*Prasoon et al., 2000*).

De la misma forma para explicar el aumento en la concentración del OLH 2 se sugiere que haya sucedido una hidrólisis de un tetrasacárido fucosilado para la obtención de un trisacárido fucosilado como 3'fucosil-lactosa, siguiendo esta hipótesis podemos sugerir una reacción similar para la disminución en la concentración del OLH 5; bajo ese principio se puede estimar que se trata de la ruptura del enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) de Lacto-N-Difucohexaosa o la ruptura del enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) de Sialil lacto-N-difucopentaosa V, los cuales tienen un grado de polimerización 6.

Por otro lado para explicar el aumento en la concentración del oligosacárido clasificado con grado de polimerización  $>6$  (OLH7) se sugiere que pudieron presentarse reacciones debido a la actividad de transferasa, es decir, que dentro de la solución exista alguna transferasa que produzca la síntesis de oligosacáridos aumentando su concentración, luego de la polimerización.

### **Pruebas de adherencia con OLH defucosilados.**

Tras la cuantificación de los oligosacáridos defucosilados se realizaron las pruebas de adherencia para observar el efecto que tiene la defucosilación en la interacción con las células de *E. coli*, reportándose como reducción de la concentración de cada oligosacárido ya que como se mencionó anteriormente, el porcentaje que se haya reducido la concentración nos indica que existe una adherencia de las células de *Escherichia coli* a estos oligosacáridos.

En la Tabla 8 se puede observar que la adherencia fue menor respecto a la prueba con los oligosacáridos de leche humana purificados (Tabla 6), con lo que podemos sugerir que la fucosa juega un papel importante en la adherencia con *E. coli* ya que resulta ser un receptor importante para ésta.

Aunque no se sabe con exactitud qué tipo de estructuras son las que presentan mayor interacción con esta bacteria, podemos asegurar que los oligosacáridos fucosilados podrían desempeñar un papel importante en el efecto protector a los infantes.

Encontramos un resultado interesante en la cuantificación de la adherencia con los oligosacáridos defucosilados en el pico correspondiente a la lactosa o al grado de polimerización 2, pues resulta una adherencia de 11.57%, resultado menor que el obtenido en la prueba con lactosa en solución, tiene sentido ya que suponiendo las condiciones intestinales, los oligosacáridos tendrán mayor reconocimiento por las células de *E. coli*, que los disacáridos que se encuentren en el intestino del neonato.

*Tabla 8. Resultados de las exposiciones de las células de Escherichia coli con los oligosacáridos defucosilados.*

<b>Oligosacárido</b>	<b>Grado de polimerización estimado</b>	<b>Adherencia (%)</b>
<b>Lactosa</b>	2	11.57
<b>OLH 2</b>	4	7.28
<b>OLH 3</b>	5	3.33
<b>OLH 4</b>	6	8.06
<b>OLH 5</b>	>6	4.84
<b>OLH 6</b>	>6	5.61
<b>OLH 7</b>	>6	-

Aunque los cambios en las concentraciones de los OHL descritos en la Tabla 7 no parecen ser tan diferentes, si se observaron cambios en la adherencia de oligosacáridos con grado de polimerización 3 que disminuyeron en un 80% y en los oligosacáridos con grado de polimerización 5 la adherencia disminuyó en un 50%.



No consideramos que exista metabolismo de estos oligosacáridos por *E. coli* en esta prueba, pues por el tiempo de exposición resultaría complicado pensar que este microorganismo sintetizara las enzimas para metabolizar estos compuestos, mismas que sí presentan microorganismos como *Lactobacillus* y las del género *Bifidobacterium*.

Aunque esta técnica no es concluyente es un método rápido para demostrar que existe interacción entre los oligosacáridos y las células de *E. coli*, evitando la colonización del intestino por este patógeno. Por ello la importancia de la lactancia humana, y de la composición de esta frente a la protección de los infantes a enfermedades gastrointestinales.

En los carbohidratos estudiados se vio una disminución importante en la concentración de galactosa y fucosa, estos, se encuentran asociados al efecto anti-infeccioso de los OLH.

En cuanto a las pruebas de adherencia con oligosacáridos de leche humana se observó que existe una adherencia a *E. coli* tal como se ha reportado en la literatura, sin embargo es necesario conocer qué tipo de oligosacáridos se tienen para poder concluir sobre que oligosacáridos existen estas interacciones.

Para las pruebas con los oligosacáridos defucosilados encontramos que la adherencia a *E. coli* fue menor con lo que se comprueba que la fucosa es de gran importancia para la adherencia de estos oligosacáridos a patógenos ya que es un sitio de reconocimiento de estos evitando la colonización del intestino.

## CONCLUSIONES

Se logró la implementación de un método rápido para estudiar la adherencia de oligosacáridos de leche humana a *Escherichia coli*, en condiciones intestinales de pH y temperatura.

Existe una relación importante en la adherencia de monosacáridos como fucosa y galactosa con *E. coli*, pues fueron los azúcares con mayor interacción en la prueba.

Se comprobó la existencia de 2'fucosil-lactosa en la muestra, de manera indirecta con la hidrólisis por fucosidasa. Además se comprobó que si existe interacción de este trisacárido con las células de *E. coli*.

Los oligosacáridos defucosilados presentaron menor interacción con *E. coli* con lo que se comprueba la importancia de la fucosa en los oligosacáridos de la leche humana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barrón, N. (2013). *Estudio de la producción de fucosidasas intracelulares de bacterias ácido-lácticas* (tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México.
2. Brand, M., Mc Veagh, P., Mc Neil, Y., & Gillard, B. (1992). Human milk oligosaccharides are not digested and absorbed in the small intestine of young infants. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia 1995*, 16, pp.19-44. 1991, De Informit Base de datos.
3. Brunser, O. (2013). El desarrollo del microbiota intestinal, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 40, pp.283-289. Disponible en línea: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000300011>
4. Cervera, P. (1994). Necesidades nutricionales y alimentación en el primer año de vida. En: *Alimentación Materno Infantil 1994*, pp. 79-119. Barcelona: Masson Sa.
5. Chirido, F., Menéndez, A., Pita, M., Sosa, P., Toca, M., Trifone, L. & Vecchiarelli, C., (2011). *Prebióticos en salud infantil*. febrero 1, 2017, de *Arch. argent. pediatr.* Sitio web: <http://www.scielo.org.ar/pdf/aap/v109n1/v109n1a11.pdf>
6. Coppa, G., Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A. & Giorgi PL. (1993, marzo). Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*, Vol. 91, pp. 637-641.
7. Crane, J., Azar, S., Stam, A., & Newburg, D., (1994, enero). Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the Escherichia coli heat-stable enterotoxina (STa) in T84 intestinal cells. *The Journal of Nutrition*, 124, pp. 1247-1255.
8. Domínguez, A., Vázquez, L. & Ramos, G., (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59, pp. 358-368.

9. Drasar, D. & Hill, M., (1974). *Human intestinal flora*, London, UK: Academic Press.
10. Hawiet, A., Kitova, E. & Klassen, J., (2015). Recognition of human milk oligosaccharides by bacterial exotoxins. *Glycobiology*, 25, pp. 845-854.
11. Eslava, C., Mateo, J. & Cravioto, A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México, 1994: 251
12. Feachem, R. & Koblisjy, M., (1984). An intervention of the control of diarrhoeal disease among young children: promotion of breastfeeding. *Bull World Health Organ*, 62, pp. 271-263.
13. Gibson, G. & Roberfroid, M., (1995). Dietary Modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 195, pp. 1401-1412.
14. Gibson, G., (2004), Fibre and effects on probiotics (The Prebiotic Concept). *Clinical Nutrition Journal*, 1, pp. 25-31.
15. Gibson, GR., Probert, H., Loo, J., Rostall, R. & Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human milk colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, pp. 259-275.
16. Girón, J., Ho, A. & Schoolnik, G. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 254, pp. 710-713.
17. Gómez, C., Pérez, D., Bernal, M., Periago, M., & Ros, G. (2009). Compuestos funcionales de la leche humana. *Enfermería Global*, 16, pp. 1-14.
18. Gudiel, M. & Goñi, I., (2001). Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51. Disponible en línea [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000406222001000400002](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222001000400002)
19. Harris, N., Spoerri, I., Schopfer, J. & Nembrini, C. (2006). Mechanisms of Neonatal Mucosal Antibody Protection. *The Journal of Immunology*, 177, pp. 6256-6262. Disponible en: [www.jimmunol.org/cgi/content/full/177/9/6256](http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/177/9/6256).

20. Howie, P., Forsyth, J., Ogston, S., Clark, A. & Florey, C. (1990). Protective effect of breast feeding against infection, *British Medical Journal*, 300, pp. 11-16. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1661904/pdf/bmj00160-0017.pdf>
21. Jenkins, D., Kendall, C. & Vuksan, V. (1999) Inulin, oligofructose and intestinal function. *The Journal Nutrition*, 129, p.143.
22. Katayama, T. (2016). Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe : human milk oligosaccharides and bifidobacteria, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, pp. 621-632.
23. Kunz, C, Rudloff S, (1993). Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatrica*. 82: 903-912.
24. Kunz, C., Rudloff, S., Baie, W., Klein, N. & Strobet, S. (2000). Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional and Metabolic Aspects. *Annual Review Nutrition*, 20, pp. 699-722.
25. Kunz, C. (2012). Historical Aspects of Human Milk Oligosaccharides, American Society for Nutrition, *Advances in Nutrition An International Review Journal*, 3, pp. 430-439.
26. Kunz, C., Kuntz, S. & Rudloff, S. (2014). *Bioactivity of Human milk oligosaccharides: Production, analysis and Bioactivit*. Spain: IFT Press.
27. Lane, J., Mariño, K., Rudd, P., Carrington, S., Slattery, H. & Hickey, R. (2012). Methodologies for screening bacteria-carbohydrate interaction: anti-adhesive milk oligosaccharides as a case study, *Journal of Microbiological Methods*, 90, pp. 53-39.
28. Lawrence, R. & Lawrence, R. (1996). *Lactancia materna: Una guía para la profesión médica*. España: Elsevier Madrid, p. 91.
29. Sosa, S., Martin, M. & Hueso, P. (2002). The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic Escherichia coli human strains. *The Journal of Nutrition*, 132, pp. 3067-3072.
30. McVeagh, P. & Miller, J. (1997). Human Milk Oligosaccharides: only the breast. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 33, pp. 281-286.

31. Miller, J., Bull, S., Miller, J. & McVeagh, P. (1994). The oligosaccharides in human milk: temporal and individual variations in monosaccharides components. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, 19, pp. 371-376.
32. Miñaña, V. (2007). Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediátrica Española*, 65, pp. 129-133.
33. Morrow, A. & Rangel, J. (2004). Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care seminars in pediatric infectious diseases. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, pp. 221-228.
34. Morrow, A., Ruiz, G., Jiang, X. & Newburg, D. (2005). Human Milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding against infectious diarrhea. *The Journal of Nutrition*, 135, pp. 1304-1307.
35. Newburg, David. (2000). Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30, pp.8-17.
36. Ofek I., Sharon N. (1990). Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Current Topics Microbiology and Immunology* 151: 91-113.
37. Prasson, C., Warren, C., Altaye, M., Morrow, A., Ruiz, G., Pickering, L. & Newburg, D. (2001). Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*, 11, pp. 365-372.
38. Rähä, N. (1985). Nutritional proteins in milk and the protein requirement of normal infants. *Pediatrics*, 75, pp. 136-141.
39. Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, pp. 830S-837S.
40. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de México*, 44, pp. 464-475.
41. Rudloff, S. & Kunz, C. (2012). Milk Oligosaccharides and Metabolism in Infants. *Advances in Nutrition*, 3, pp. 398-405.

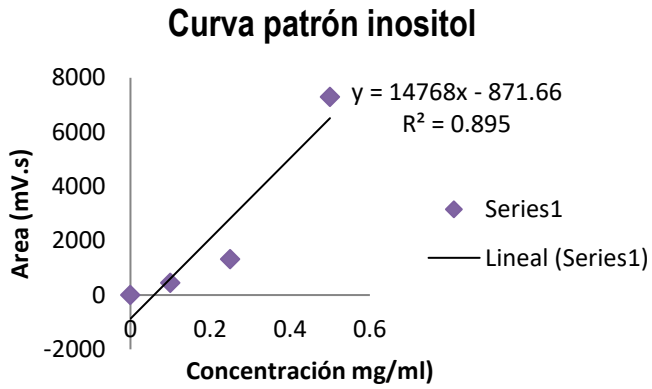
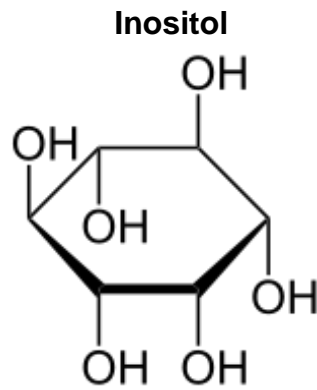
42. Ruiz, G., Cervantes, L., Ramos, P. Chavez, B. & Newburg, D. (2003). Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha, 1 2 Gal beta 1 4GlcNAc), and fucosyl oligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, pp. 112-120.
43. Sharon, N. (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, pp. 527-537.
44. Singh, S., Scigelova, M., Vic, G. & Crout, David. (1996). Glycosidase-catalysed oligosaccharide synthesis of di-, tri- and tetra-saccharides using the N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* and the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of the Chememical Society*, 1, pp. 1921-1926.
45. Temboury, M. (2007). Composición de la leche humana. Lactancia Humana. Guía para profesionales. *Monografías de la Asociación Española de Pediatría*, 59, pp. 59-76.
46. Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, pp. 48-55.
47. Wong-Madden ST, Laundry D, (1995). Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas*. USA. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7772864> Último acceso 25 noviembre de 2014.

## **ANEXOS**



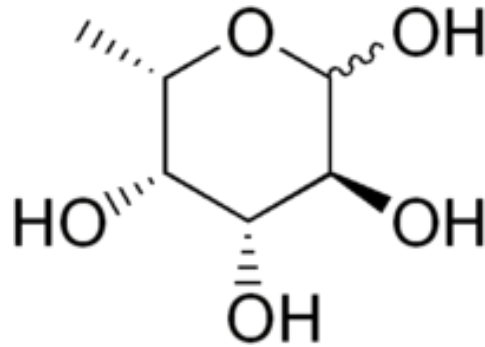
## Pruebas de adherencia con monosacáridos

Curvas patrón para cada uno de los carbohidratos de estudio

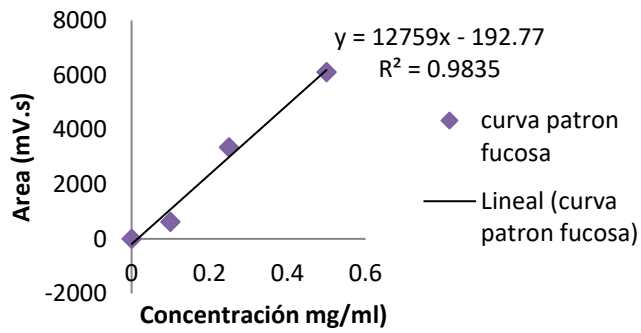


Concentración (mg/ml)	Area (Mv.s)
0	0
0.1	450.629
0.25	1324.055
0.5	7291.115

## Fucosa

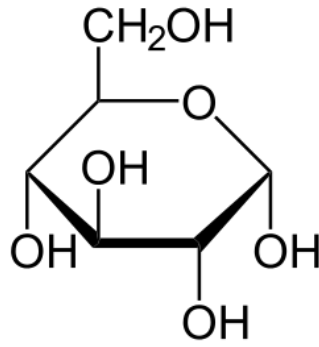


### curva patrón fucosa



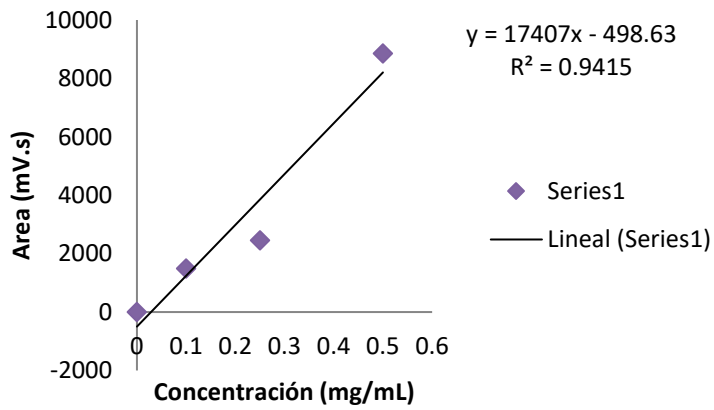
Concentración (mg/ml)	Area (Mv.s)
0	0
0.1	619.0215
0.25	3353.9475
0.5	6100.937

## Glucosa



PM.180.06  $\frac{g}{mol}$

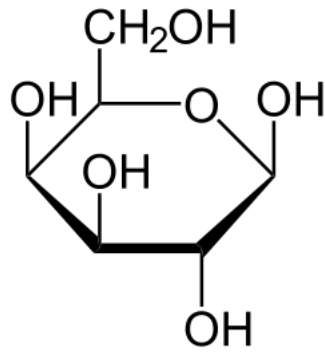
### Curva patrón glucosa



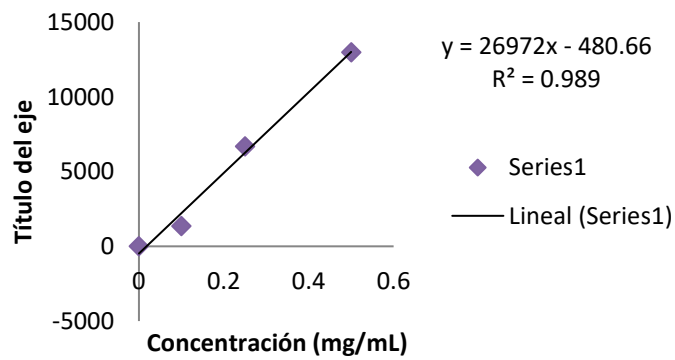
Concentración (mg/ml)	Area (Mv.s)
0	0
0.1	1490.13
0.25	2458.86
0.5	8852.25

Perfil de glucosa en HPLC

## Galactosa

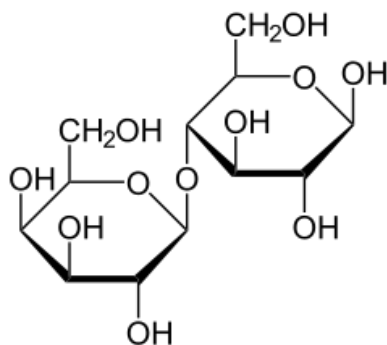


### Curva patrón galactosa



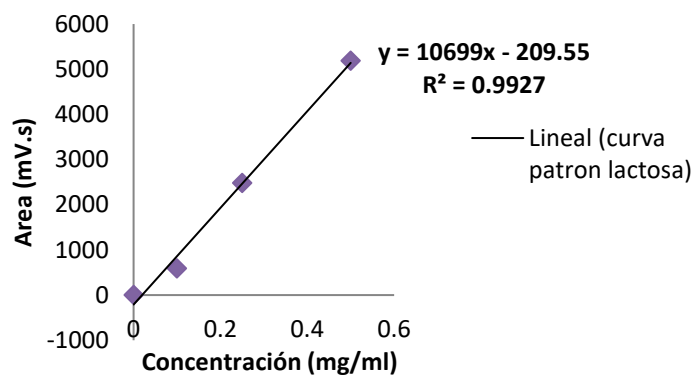
Concentración (mg/ml)	Area (Mv.s)
0	0
0.1	1354.29
0.25	6680.49
0.5	12968.5305

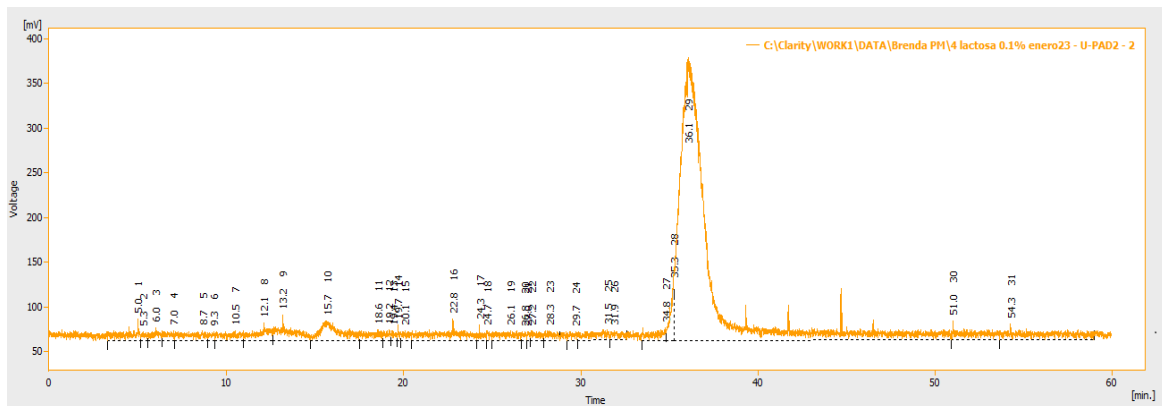
## Lactosa



Concentración (mg/ml)	Area (Mv.s)
0	0
0.1	588.6255
0.25	2480.6605
0.5	5186.276

### curva patrón lactosa





### Cálculo de concentración final de carbohidratos

Con los datos obtenidos en las gráficas anteriores podemos obtener cual es la concentración de carbohidrato luego de la prueba de adherencia.

Algoritmo del cálculo

$$y = mx + b$$

Donde:

$y = \text{área del pico}$

$m = \text{pendiente de la recta}$

$x = \text{concentración } \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$b = \text{ordenada al origen}$

$$\text{concentración final de carbohidrato } \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = \frac{\text{área del pico} - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente}}$$

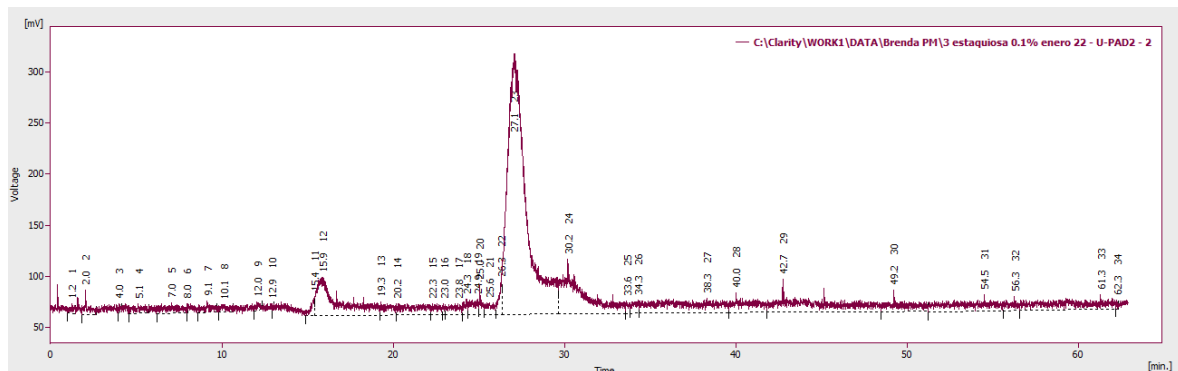
Ejemplo

Área del pico de la prueba con galactosa **4853.843 Mv.S**

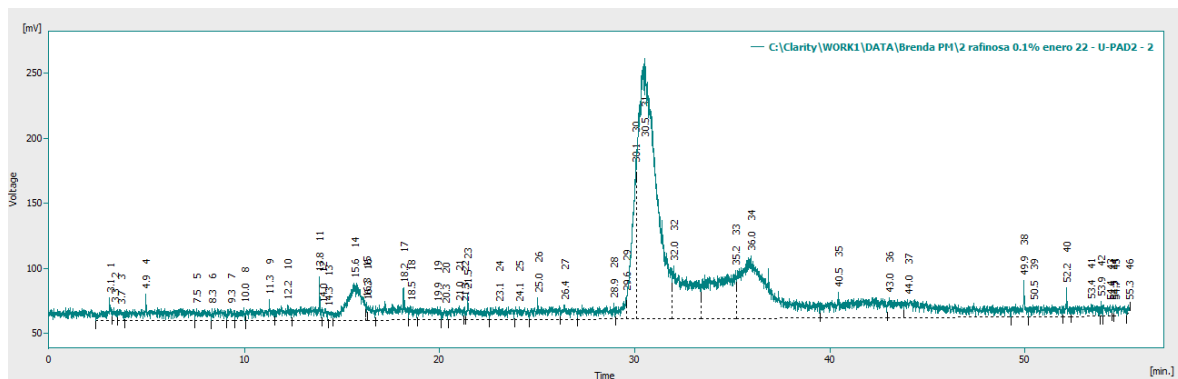
Ecuación de la curva patrón = **26972x - 480.66**

$$\text{concentración final de galactosa } \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = \frac{4853.843 - (-480.66)}{26972} = 0.19 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

### Perfil de oligosacáridos estándar



Cromatograma 3. Perfil de estaquiosa 0.5%



Cromatograma 2. Perfil de rafinosa 0.5%

Tabla 1. Referencia de carbohidratos estándar

<b>Carbohidrato</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Grado de polimerización</b>
<b>Lactosa (disacárido)</b>	36	2
<b>Rafinosa( Trisacárido)</b>	32	3
<b>Estaquiosa(Tetrasacárido)</b>	27	4